



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

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, MODELAGEM
MATEMÁTICA E VALIDAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *SALMONELLA* EM
SUSHIS EXPOSTOS A DIFERENTES CENÁRIOS DE TEMPO E
TEMPERATURA DE DISTRIBUIÇÃO

DANIELLE CARMO DA SILVA

Porto Alegre
2020

Danielle Carmo da Silva

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO MICROBIANA, MODELAGEM
MATEMÁTICA E VALIDAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *SALMONELLA* EM
SUSHIS EXPOSTOS A DIFERENTES CENÁRIOS DE TEMPO E
TEMPERATURA DE DISTRIBUIÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Eduardo César Tondo

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

da Silva, Danielle Carmo

Avaliação da contaminação microbiana, modelagem matemática e validação da multiplicação de Salmonella em sushis expostos a diferentes cenários de tempo e temperatura de distribuição / Danielle Carmo da Silva. -- 2020.

74 f.

Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2020.

1. comida japonesa. 2. avaliação da exposição. 3. microbiologia preditiva. 4. uramaki. 5. patógeno transmitido por alimentos. 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).

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

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

Título da dissertação: Avaliação da contaminação microbiana, modelagem matemática e validação da multiplicação de *Salmonella* em sushis expostos a diferentes cenários de tempo e temperatura de distribuição

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

Aprovada em: _____ / _____ / _____

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Patricia da Silva Malheiros
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Roberta Cruz Silveira Thys
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Rochele de Quadros Rodrigues
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

À minha melhor amiga, companheira, conselheira e mãe, por todo apoio dado, sempre acreditando nos meus sonhos e me ajudando a realizá-los.

Ao meu orientador, Eduardo, pela confiança e por todos os ensinamentos passados e que se tornou imprescindível para a realização deste trabalho, como para a construção da profissional que sou hoje.

À minha amiga e colega há 10 anos, Stefani, por toda ajuda dada desde o início, com suas palavras de incentivo, suas contribuições relevantes e seu tempo disponível para me auxiliar, sempre acreditando em mim, até quando nem eu mesma acreditava.

Aos amigos Henrique e Leonardo pela ajuda no paper.

Aos meus colegas do laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, em especial à Larissa, Nathanyelle e Susana por toda ajuda, contribuição e momentos de descontração e alegria nesses últimos dois anos.

“Todo o crescimento, desenvolvimento pessoal e aprendizagem é gerado quando você está fora das suas zonas de conforto. Experimente coisas novas. Procure sempre rir de si mesmo e se permita estar equivocado.” (Steve Allen)

RESUMO

Sushi é uma preparação de origem japonesa, caracterizada pela união de arroz temperado com outros ingredientes crus, como por exemplo, peixes e legumes. A sua preparação e distribuição necessita de significativa manipulação e longos períodos, o que podem permitir a ocorrência de surtos alimentares causados por diversos microrganismos, dentre eles a *Salmonella*. Em nível nacional, não há legislação brasileira específica para sushis, sendo que os parâmetros de temperatura de distribuição exigidos pelas vigilâncias sanitárias podem prejudicar a qualidade sensorial dessa preparação e são difíceis de atingir em *buffets* de restaurantes. O objetivo deste estudo foi analisar a contaminação microbiana e validar um modelo matemático desenvolvido para prever a multiplicação de *Salmonella* em sushis expostos a diferentes cenários de tempo e temperatura. Para tanto, a distribuição de sushis foi avaliada em 26 restaurantes do sul do Brasil, a fim de identificar cenários reais de tempo e temperatura. Os tipos de sushi mais consumidos também foram identificados, e seus ingredientes, pH e contagem de microrganismos mesófilos totais foram analisados. Um *pool* de *Salmonella* foi inoculado em sushis e curvas de multiplicação foram realizadas em temperaturas de 7, 15, 20, 25 e 37 ° C, a fim de construir um modelo matemático de predição da multiplicação de *Salmonella* em diferentes temperaturas isotérmicas e não isotérmicas. Os resultados demonstraram que os três principais tipos de sushi consumidos foram nigiri, uramaki e hosomaki e não houve diferença significativa entre as temperaturas de distribuição dos mesmos, as quais foram em média de 16 °C. O arroz temperado apresentou pH próximo de 4,4 o que promoveu uma diminuição do pH do salmão nos sushis, porém esse pH não inibiu completamente a multiplicação de *Salmonella*. O sushi uramaki demonstrou ter as contagens totais mais altas e, por esse motivo, foi escolhido para desenvolver os modelos matemáticos. O modelo de Baranyi e Roberts (1994a) foi selecionado como o mais adequado para descrever as curvas de multiplicação de *Salmonella*, gerando valores de R² superiores a 0,99 para os modelos primários. Nas temperaturas de 7, 15, 20, 25 e 37 ° C, a fase *lag* de *Salmonella* foi de aproximadamente 78,0, 14,1, 7,2, 5,9 e 3,4 horas, respectivamente. A equação de Ratkowsky (1982) foi utilizada para obter o modelo secundário, gerando R² de 0,99 e RMSE de 0,02. A multiplicação de *Salmonella* foi simulada em condições não isotérmicas, utilizando o pior cenário observado em estabelecimentos de sushi, a fim de validar o modelo desenvolvido. A validação foi realizada a 36,3 °C por 6h, 10 °C por 24h e 29,5 °C por 6h, sequencialmente, onde a concentração de *Salmonella* atingiu 6,7 log UFC/g após esses períodos. Considerando que a média das temperaturas de distribuição mais altas das peças de uramaki foi de aproximadamente 18 °C, o tempo de multiplicação insignificante (ζ) para *Salmonella* foi de 8,9 horas. No entanto, as contagens de microrganismos mesófilos totais no sushi uramaki demonstraram que a 15 °C, a fase *lag* foi de 10,9 ± 7,7 horas e, com base neste resultado e nos dados de multiplicação de *Salmonella*, sugere-se que o binômio de tempo e temperatura adequado para a distribuição de sushi seria de ≤15 °C por até 6h, considerando que esse é o tempo máximo de distribuição de alimentos permitido no Brasil.

Palavras-chave: comida japonesa; avaliação da exposição; microbiologia preditiva; salmão; uramaki; patógeno transmitido por alimentos.

ABSTRACT

Sushi is a preparation from Japan, characterized by the combination of seasoned rice with other raw ingredients, such as fish and vegetables. Its preparation and distribution requires significant handling and long periods, which has favored the occurrence of food outbreaks diseases caused by *Salmonella*. Brazilian national legislation does not provide specific care for this preparation, and the distribution temperature parameters required by sanitary surveillance do not favor the sensory quality of sushi and are difficult to achieve in restaurant buffets. The aim of this study was to analyze microbial contamination and validate a mathematical model developed to predict the growth of *Salmonella* in sushi exposed to different time and temperature scenarios. The distribution of sushi was evaluated in 26 restaurants of Southern Brazil, in order to identify real time and temperature scenarios. The most consumed sushi types were also identified, and its ingredients, pH and total aerobic mesophilic counts were analyzed. A pool of *Salmonella* was inoculated into sushi and growth curves were performed at temperatures of 7, 15, 20, 25 and 37 °C in order to construct a mathematical model to predict *Salmonella* growth at different isothermal and non-isothermal temperatures. Results demonstrated that the three main types of sushi consumed were nigiri, uramaki and hosomaki and there were no significant differences among distribution temperatures of them i.e around 16 °C. Seasoned rices had a pH close to 4.4, which promoted a decrease in salmon pH in sushi, but this pH did not completely inhibited the *Salmonella* growth. Uramaki sushi demonstrated the highest total aerobic mesophilic counts and for this reason it was chosen to develop the mathematical models. Baranyi and Roberts (1994b) model was selected as the most suitable to describe the *Salmonella* growth curves, generating R² values greater than 0.99 for primary models. At 7, 15, 20, 25 and 37 °C, *Salmonella* lag phase were approximately 78.0, 14.1, 7.2, 5.9 and 3.4 hours, respectively. Ratkowsky's (1982) equation was used to obtain the secondary model, generating R² of 0.99 and RMSE of 0.02. *Salmonella* growth was simulated under non-isothermal conditions, using the worst-case scenario observed in sushi establishments, in order to validate the model. Validation was performed at 36.3 °C for 6h, 10 °C for 24h and 29.5 °C for 6h sequentially and *Salmonella* concentration reached 6.7 log CFU/g after these periods. Considering that the average of the higher distribution temperatures of uramaki pieces was approximately 18 °C, the negligible growth time (ζ) for *Salmonella* was 8.9 hours. However, total mesophilic counts in uramaki demonstrated that at 15 °C, the lag phase were 10.9 ± 7.7 hours and based on this result and data from *Salmonella* growth, suggests that an adequate binomial of time and temperature for sushi distribution could be ≤15 °C for the maximum time of food distribution allowed in Brazil (6 hours).

Keywords: japanese food; exposure assessment; predictive microbiology; salmon; uramaki; foodborne pathogen.

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: curva de multiplicação microbiana dividida em suas quatro fases (*lag*, exponencial, estacionária e declínio) 24

CAPÍTULO 2

Figure 1: Total aerobic mesophilic counts of hosomaki, nigiri, uramaki, and salmon of the establishments visited, analyses were performed in triplicate. Each block represents the total count variation of the pieces in the establishments. Tukey test ($p \leq 0.05$) * shows significant differences..... 45

Figure 2: Primary models obtained by growth of *Salmonella enterica* in sushi exposed at isothermal temperatures (7, 15, 20, 25 and 37 °C), experimental data fitted in DMFit/ComBase. Each point represents an average of triplicate results. 47

Figure 3: Validation of the growth models developed to *Salmonella enterica* in sushi under non-isothermal conditions. Dashed line represents the temperature, from 0 to 6h (36.3 °C), 6h to 29h (10 °C) and 29 to 25h (29.5 °C) sequentially. The points are the concentrations of *S. enterica* experimentally obtained under non-isothermal temperatures and the straight line is the mathematical model predicted in Matlab software..... 50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1: pH values of nigiri, uramaki, hosomaki, and its ingredients separately measured 43

Table 2: Parameters of primary models (maximum growth rate, lag time and maximum population density (N_{max}) of *Salmonella enterica* inoculated in sushi and predicted by Combase Broth Models at isothermal temperatures. 48

Table 3: Secondary model obtained from growth rate of *Salmonella enterica* growing in sushi exposed under isothermal temperatures 48

Table 4: Negligible growth time (ζ) parameter (h) calculated to *Salmonella enterica* in sushi. 51

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO 1:	11
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 OBJETIVOS.....	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivos Específicos	14
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.3.1 Serviços de Alimentação	16
1.3.2 <i>Salmonella</i>	17
1.3.3 Sushi	19
1.3.4 Legislação	21
1.3.5 Multiplicação Microbiana	24
1.3.6 Microbiologia Preditiva	25
2 CAPÍTULO 2:	29
Mathematical modelling and validation of <i>Salmonella enterica</i> growth in sushi exposed to different time and temperature scenarios found in real sushi establishments.....	29
3 CAPÍTULO 3:	58
3.1 DISCUSSÃO GERAL.....	58
3.2 CONCLUSÃO	63
4 REFERÊNCIAS	64

1 CAPÍTULO 1:

1.1 INTRODUÇÃO

Sushi é um tradicional prato da culinária japonesa e consiste principalmente de arroz cozido, acidificado com vinagre e resfriado, o qual é moldado em peças pequenas cobertas com peixe cru ou cozido, ou em formato de rolo contendo peixes ou legumes e, muitas vezes, envolto em algas marinhas (LIANG et al., 2016). A preparação do sushi envolve muita manipulação e o uso frequente de ingredientes crus, aumentando o risco de contaminação microbiana e, possivelmente, a ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Patógenos como a *Salmonella* podem ser introduzidos nessa preparação através da matéria-prima (principalmente os peixes) ou por contaminação cruzada via utensílios e mãos dos manipuladores, sendo que há pouca ou nenhuma etapa de processamento térmico capaz de eliminar essa contaminação microbiana.

Salmonella é um dos principais patógenos causadores de DTA no mundo. Nos EUA, estima-se que essa bactéria causa cerca de 1,35 milhões de infecções, 26.500 hospitalizações e 420 mortes a cada ano (CDC, 2019a). No Brasil, na última década, 11,8% dos agentes etiológicos de surtos alimentares notificados oficialmente foram identificados como *Salmonella* (BRASIL, 2019a). Diversos estudos relataram a presença desse patógeno em surtos de origem alimentar envolvendo sushis, como por exemplo, em 2004, na Austrália, um surto de salmonelose foi associado ao consumo de rolos de sushi (BARRALET et al., 2014). Em 2012, nos EUA, um surto de salmonelose afetou mais de 400 pessoas de 28 estados após o consumo de peixe cru do sushi (CDC, 2012). No mesmo ano, no Brasil, 30 pessoas sofreram infecção alimentar devido ao consumo de sushi contaminado por *Salmonella* (BRASIL, 2012).

Nos últimos anos, o número de restaurantes de culinária japonesa aumentou consideravelmente. Além disso, atualmente, restaurantes que possuem *buffet* com alimentos variados, conhecidos como *self-services*, vem

oferecendo sushis e outras preparações com pescados crus. Por definição, o restaurante tipo *self-service* é aquele onde o próprio cliente se serve, em pistas (balcões) onde os alimentos são expostos e distribuídos. De acordo com a legislação brasileira de Boas Práticas (BP) para serviços de alimentação (BRASIL, 2004), após serem submetidos à cocção, os alimentos preparados devem ser mantidos em condições de tempo e de temperatura que não favoreçam a multiplicação microbiana. Para conservação a quente, os alimentos devem ser submetidos à temperatura superior a 60 °C por, no máximo, 6 horas. Alimentos que necessitam de resfriamento no geral devem ser conservados sob refrigeração a <5 °C ou congelamento a ≤ -18 °C, sendo distribuídos e consumidos em até 5 dias.

Embora o tempo de distribuição de alimentos refrigerados não esteja definido na legislação brasileira, normalmente os restaurantes assumem que 6 horas é o período máximo para a distribuição dos alimentos refrigerados a <5 °C. No entanto, diversos estabelecimentos distribuem os sushis à temperatura ambiente por algumas horas, uma vez que temperaturas <5 °C podem comprometer a qualidade sensorial dos sushis por diminuir a percepção de sabor do produto (NSW, 2008). A exposição desses alimentos em temperaturas não refrigeradas pode resultar em surtos de DTA, principalmente se os sushis forem preparados sem práticas adequadas de manipulação (LUCCA; DA SILVA TORRES, 2006; NG et al., 2013).

No Brasil, em nível nacional, não existe uma legislação com procedimentos específicos para preparação e distribuição de sushis. No entanto, duas capitais brasileiras, Porto Alegre no Rio Grande do Sul (BRASIL, 2016) e Fortaleza no Ceará (BRASIL, 2019b), elaboraram regulações que aprovam as exigências mínimas para produção, preparo e comercialização de sushis e sashimis. Dentre os diversos itens citados nessas legislações, destaca-se a obrigatoriedade da temperatura de exposição no *buffet*, similar à legislação brasileira para serviços de alimentação (<5 °C) (BRASIL, 2004). Embora as legislações exijam a distribuição refrigerada desse tipo de preparação, diversos estudos demonstram a dificuldade em manter o sushi em temperaturas <5 °C,

durante a exposição no balcão de distribuição por se tratar de uma temperatura de refrigeração adequada mas difícil de ser mantida em alimentos expostos em um balcão de distribuição (BARRALET et al., 2014; NSW, 2008; SA HEALTH, 2012).

Diante do exposto, avaliar a contaminação e a multiplicação microbiana em sushis, nas condições reais de distribuição, assume grande importância, o que é a principal finalidade desse trabalho.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a contaminação microbiana e desenvolver um modelo matemático para prever a multiplicação de *Salmonella* em sushis expostos a diferentes cenários de tempo e temperatura de distribuição.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o tempo e a temperatura dos principais sushis consumidos, durante as suas distribuições em restaurantes;
- Identificar diferentes cenários de tempo e temperatura de distribuição de sushis;
- Avaliar o pH dos sushis e dos seus ingredientes;
- Avaliar a influência do pH do arroz temperado no pH do peixe nos sushis;
- Avaliar a contagem de microrganismos mesófilos totais dos sushis dos estabelecimentos;
- Identificar qual tipo de sushi apresenta maior contaminação microbiana;
- Analisar a contagem de microrganismos mesófilos totais e a multiplicação de *Salmonella* em sushis expostos a diferentes temperaturas;
- Desenvolver um modelo matemático de multiplicação para prever o comportamento de *Salmonella* em sushis em condições isotérmicas e não-isotérmicas entre 7 e 37 °C;
- Validar o modelo de multiplicação desenvolvido em diferentes cenários identificados para sushis;

- Comparar os modelos de multiplicação obtidos a modelos gerados em *softwares* de microbiologia preditiva;
- Contribuir para a identificação de parâmetros seguros de tempo e temperatura para a etapa de distribuição de sushis em *buffets*;

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Serviços de Alimentação

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

Dentre os principais serviços de alimentação, os restaurantes com *buffet* (*self-services*) representam 41,5% entre os mais procurados pelos consumidores (ABRASEL, 2019). Nesse país, a cada dez restaurantes de pequeno porte, seis são do tipo *self-service* e, aproximadamente, 61% desses estabelecimentos trabalham com a modalidade de atendimento *self-service* em algum momento do dia, sendo que 47% atendem exclusivamente com esse tipo de serviço (SEBRAE, 2017). O restaurante *self-service* é aquele onde os alimentos estão dispostos em pistas (balcões) aquecidos e refrigerados, onde o próprio cliente escolhe os componentes do seu prato. Entre as principais razões para a escolha desses estabelecimentos pelos clientes, estão o preço e a praticidade, além de que os consumidores os consideram uma forma rápida de se alimentar. Além disso, outro fator que afeta no poder de escolha, é variedade de itens no cardápio com diversas opções de alimentos (SANCHES; SALAY, 2011), dentre eles, os alimentos diferentes da cultura brasileira, como é o caso do sushi. Por ser um produto que tem um apelo refinado, a inserção dos sushis nesses locais, permite

que alimentos desse estilo possam ser consumidos com um custo mais acessível e em maiores quantidades.

Os restaurantes *self-services* podem apresentar diversos riscos para a segurança dos alimentos, como por exemplo, a possibilidade de contaminação cruzada, a exposição dos alimentos ao ambiente, a contaminação através da saliva dos consumidores falando sobre os alimentos e, principalmente, à falta de controle de tempo e temperatura no balcão de distribuição, visto que abusos deste binômio podem ocasionar a multiplicação de bactérias causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (ZANDONADI et al., 2007). Dentre elas, encontra-se a *Salmonella*, uma das principais causadoras de surtos alimentares no mundo (BESSER, 2018).

1.3.2 *Salmonella*

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

Os humanos e os animais, principalmente as aves, são reservatórios desses microrganismos em seu trato intestinal. Em geral, a infecção causada pelas bactérias da espécie *S. enterica* está comumente associada à ingestão de alimentos e água contaminados, principalmente os que possuem alto teor de umidade, proteína e carboidrato, como carne bovina, suína e de aves, ovos, leite e derivados, frutos do mar e sobremesas, e é denominada de salmonelose (CDC,

2014). Os sintomas relacionados a esta doença são para maioria das pessoas saudáveis: diarreia, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça e às vezes febre que se manifestam entre seis a 72 horas após a ingestão dos alimentos contaminados com duração de 2 a 7 dias (HOFFMANN; MACULLOCH; BATZ, 2015). No entanto, infecções mais severas podem ocorrer em pessoas imunodeprimidos, onde a penetração da bactéria na corrente sanguínea pode ocasionar até a morte (JAY, 2005). Apesar da dose infectante típica para humanos ser em torno de 10^6 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g, há relatos de surtos com doses infectantes menores a 10 células de *Salmonella* por grama, pois a quantidade de células necessária para causar uma infecção humana depende da virulência de cada cepa, do grau de resistência do hospedeiro, da matriz alimentar e do estado fisiológico das células bacterianas (HUMPHREY, 2004).

A *Salmonella* é responsável por 180 milhões, ou 9% das doenças diarreicas que ocorrem globalmente a cada ano (BESSER, 2018). Nos EUA, um milhão de pessoas adoecem ao ano, devido à infecção alimentar por *Salmonella*, o que representa 11 % do total de DTA no país, e cerca de 380 pessoas chegam a óbito no país (HOFFMANN; MACULLOCH; BATZ, 2015). Na União Europeia (EU), um em cada três surtos de origem alimentar em 2018 foi causado por *Salmonella* (EFSA, 2019). No Brasil, na última década, 11,3 % dos agentes etiológicos de surtos alimentares notificados foram identificados como *Salmonella*, sendo os restaurantes o segundo local de maior ocorrência dos surtos, contabilizando 16 % (BRASIL, 2019a).

A *Salmonella* também é frequentemente relatada em produtos prontos para o consumo, levemente cozidos ou crus, como é o caso dos sushis (NEWELL et al., 2010; QUESTED et al., 2010; TAUXE et al., 2010). Um estudo realizado pela Food and Drug Administration (FDA) mostrou que os níveis de contaminação por *Salmonella* em produtos prontos para o consumo envolvendo o uso de frutos do mar crus, nos EUA, foi de 3,1% (HEINITZ et al., 2000). No Brasil não há dados oficiais na literatura referente ao número de surtos envolvendo *Salmonella* em frutos do mar ou em sushis.

1.3.3 Sushi

O sushi é uma preparação tradicional da culinária japonesa, que se estendeu à gastronomia contemporânea global (DE SILVA; YAMAO, 2006). Originalmente ele se baseia na preservação do peixe no arroz mergulhado em molho de vinagre, açúcar e sal. O produto era armazenado por alguns meses até ocorrer a fermentação do amido do arroz, liberando ácido acético e ácido láctico. Neste caso, o arroz fermentado era descartado, não sendo consumido junto com o peixe. Com o passar dos anos, por serem grandes consumidores de arroz, peixes e frutos do mar, e o avanço da gastronomia, os japoneses começaram a consumir o arroz com peixe antes de se realizar a fermentação, criando o sushi como é conhecido hoje, através da adição do vinagre como o tempero do arroz (WEI, 2015). A composição do sushi consiste basicamente de arroz cozido, acidificado com vinagre, resfriado, moldado em pedaços pequenos e coberto com peixe cru ou cozido, ou formado em um rolo com peixe ou legumes e muitas vezes envolto em algas marinhas (LIANG et al., 2016). Existem cinco tipos básicos de sushi: Nare, Nigiri/Edomae, Chirashi, Sugatha e Oshi/Osaka, os quais podem ser subdivididos em numerosas subcategorias (DE SILVA; YAMAO, 2006).

Dentre os diferentes tipos de sushi, o mais popular, particularmente no mercado oriental, é o Nigiri, que consiste no arroz temperado composto por uma fina camada de peixe cru. Já no mercado ocidental, o tipo mais popular é o Sushi Roll ou Maki Sushi. Dentro da família de rolos de sushi, o Uramaki, também conhecido como rolo de sushi de dentro para fora, é o mais popular entre os ocidentais. Tal popularidade ocorreu devido a presença de ingredientes bastante familiares à cultura ocidental em sua composição e, principalmente, por possuir a opção de ser tratado termicamente (frito), pois quando o sushi Nigiri foi introduzido no ocidente, as pessoas possuíam receio ao consumir peixe cru. Isso permitiu uma fusão entre a culinária japonesa e a ocidental, fazendo com que os sabores de ambas as culturas se entrelaçassem (MAKER, 2019).

Nos EUA, o sushi tornou-se um alimento popular, consumido quase diariamente por algumas pessoas (BURGER et al., 2014). No Brasil, casas não especializadas nessa gastronomia, como restaurantes *self-services* e rodízios, adicionaram os sushis em seus cardápios para atrair clientes. No estado de São Paulo, há mais restaurantes japoneses que churrascarias, sendo que muitas também disponibilizam a culinária nipônica em seu cardápio (CANECCCHIO, 2003; CUTOLO et al, 2006). No município de Porto Alegre, somente no ano de 2012, 188 serviços de alimentação comercializavam sushis em seus estabelecimentos (CGVS, 2012).

Com o crescente consumo de sushi no mundo todo e a necessidade de inovar no mercado, muitos estabelecimentos alimentares viram os sushis como uma oportunidade para atrair mais clientes, no entanto, muitos deles não possuíam estrutura física, capacitação de funcionários e Boas Práticas adequadas para elaborar um prato típico da culinária japonesa. A preparação do sushi envolve o uso frequente de ingredientes crus e muita manipulação, o que pode aumentar o risco de contaminação microbiana (CDC, 2019b). Desta forma, nos últimos anos, vários surtos ocorreram devido ao consumo de alimentos étnicos no mundo, sendo o sushi um dos alimentos desse grupo (FUSCO et al., 2015). Diferentes estudos relataram a ocorrência de surtos de origem alimentar envolvendo sushi, sendo os principais agentes causadores identificados *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogene*, *Escherichia coli*, e *Salmonella* (CDC, 2012; CFS, 2017; PHSKC, 2010).

A presença de *Salmonella* é frequentemente relatada em surtos envolvendo produtos alimentícios prontos para o consumo (LI; KIM; YUK, 2018). No caso dos sushis, a *Salmonella* pode ser introduzida através da matéria-prima contaminada ou pela contaminação cruzada de utensílios e mãos dos manipuladores. Em Hong Kong, de 1997 a 1999, houve cinco surtos envolvendo 15 pessoas consumindo sushi e sashimi contaminado com *Salmonella* (CFS, 2017). Na Austrália, em 2004, um surto de salmonelose foi associado ao consumo de rolos de sushi (BARRALET et al., 2014). Nos Estados Unidos, em 2012, um surto de salmonelose afetou mais de 400 pessoas de 28 estados após

o consumo de peixe cru em sushi (CDC, 2012). No Brasil, também em 2012, 30 pessoas sofreram infecção alimentar devido ao consumo de sushi contaminado por *Salmonella* (BRASIL, 2012).

Com a crescente popularização dos sushis, que envolvem o uso frequente de ingredientes (principalmente de origem animal) crus, houve também o aumento do número de surtos de DTA envolvendo essa preparação. Possivelmente, uma das razões do aumento do número desses surtos é a não utilização de práticas adequadas de manipulação durante a preparação dos sushis, o controle de fornecedores de matéria prima de boa procedência, como também à escassez de parâmetros mais rigorosos estabelecidos em relação a segurança dos sushis.

1.3.4 Legislação

A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que um dos principais fatores para evitar multiplicação e a sobrevivência de microrganismos é o controle do tempo e da temperatura. Esse binômio deve ser controlado nos serviços de alimentação, a fim de garantir a inocuidade dos alimentos prontos para o consumo e prevenir surtos alimentares (WHO, 2016).

Atualmente, poucos países e cidades possuem legislações exclusivas sobre parâmetros que garantem a segurança de sushis. Na Austrália, órgãos regulamentadores desenvolveram uma guia para empresas que comercializam sushi, afim de ajudar a identificar e controlar os riscos associados a este produto. Durante a exposição no balcão de distribuição, é permitido o produto ficar em temperaturas de até 15 °C por no máximo 4h, logo após a montagem das peças, desde que o arroz temperado esteja corretamente acidificado (pH<4,6) (SA HEALTH, 2012). Nos EUA, a cidade de Nova York proibiu, em restaurantes de culinária oriental, a utilização de peixe fresco que não tivesse passado por congelamento prévio, devido a possível presença de parasitas nos peixes.

Entretanto, essa legislação não cita parâmetros de tempo e temperatura para sushis na exposição ou distribuição (DOH, 2015).

No Brasil, de acordo com a legislação brasileira de boas práticas para serviços de alimentação (BRASIL, 2004), após serem submetidos à cocção, os alimentos preparados devem ser mantidos em condições de tempo e de temperatura que não favoreçam a multiplicação microbiana. Para conservação a quente, os alimentos devem ser submetidos à temperatura superior a 60 °C por, no máximo, 6 horas. Alimentos que necessitam de resfriamento devem ser conservados sob refrigeração a <math>< 5\text{ °C}</math> ou congelamento a $\leq -18\text{ °C}$, sendo distribuídos e consumidos em até 5 dias. No entanto, essa prática não é realizada em muitos estabelecimentos, que acabam expondo os sushis à temperatura ambiente, uma vez que temperaturas inferiores comprometem a qualidade sensorial dessa preparação. Além disso, os sushis podem ficar expostos nessas condições por algumas horas, o que pode ocorrer devido à falta de um limite de tempo de exposição para os alimentos refrigerados. Sushis expostos a temperaturas elevadas por períodos muito longos podem propiciar a multiplicação microbiana e serem envolvidos em surtos de DTA, principalmente se forem preparados sem as práticas adequadas de manipulação (LUCCA; DA SILVA TORRES, 2006; NG et al., 2013).

Atualmente apenas duas cidades brasileiras apresentam legislações exclusivas para sushis. Em 2016, o município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, baseado na legislação da cidade de Nova York, elaborou uma legislação para estabelecimentos de sushis e sashimis (BRASIL, 2016). Diversos parâmetros foram estabelecidos nesse regulamento como por exemplo a obrigatoriedade de congelamento prévio em peixes oriundos de alto mar, devido a possível presença de parasitas; a obrigatoriedade da acidificação e do controle do pH do arroz ($\text{pH} \leq 4,5$), que permite seu armazenamento em temperaturas ambiente (24h), visto que em pH baixos ocorre pouca ou nenhuma multiplicação de patógenos e a possibilidade de validação do *buffet*, que permite com que o sushi fique exposto em temperaturas acima de 5 °C.

Tal validação é realizada da seguinte forma: prepara-se um lote de um único tipo de sushi (geralmente aquele que representa o pior cenário entre eles, ou seja, como ingredientes crus, com alta manipulação e com grande quantidade de ingredientes) e coloca-se peças na pista de distribuição, contendo equipamento refrigerado. Os sushis são expostos pelo maior tempo de exposição, acrescido de 30%, e na maior temperatura medida e registrada pelo estabelecimento. Ao longo deste período, em intervalos programados, são retiradas cinco amostras de sushi (quintuplicata), as quais são levadas até um laboratório terceirizado de análises de alimentos para a realização de contagem de mesófilos totais. Caso não haja multiplicação de microrganismos entre o tempo inicial e o tempo final, esse tempo e essa temperatura representam os parâmetros máximos permitidos para a exposição dos sushis, nesse estabelecimento. Dessa forma, cada local possui seu próprio binômio de tempo e temperatura para os sushis no *buffet*. No entanto, a forma correta de realizar essa validação tem sido pouco compreendida pelos estabelecimentos, além de representar um custo a mais. Ela também tem sido difícil de ser monitorada pelos fiscais da vigilância sanitária, principalmente porque cada local pode ter um binômio de tempo e temperatura diferente (BRASIL, 2016).

No final de 2019, a cidade de Fortaleza, Ceará, também lançou uma legislação para estabelecimentos de sushi (BRASIL, 2019b). Essa regulamentação é mais restritiva que a de Porto Alegre, permitindo o armazenamento do arroz acidificado em temperatura ambiente por apenas 8h, como também mantendo a rigorosidade de manter as peças de sushi em temperaturas $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ no *buffet*, conforme a RDC 216/2004, no entanto por um período ainda menor (máximo de 4h).

As legislações e recomendações em diferentes países já permitem a utilização de temperaturas superiores a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a etapa de distribuição dos sushis, desde que práticas adequadas de manipulação sejam realizadas (BRASIL, 2016; SA HEALTH, 2012). No Brasil, em nível nacional, ainda existe uma limitação em relação ao uso de temperaturas superiores a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o balcão de distribuição em alimentos refrigerados no geral, principalmente no

caso dos sushis, embora seu consumo, sua exposição e sua distribuição em temperatura ambiente seja bem usual. Portanto, é de grande importância estudar a possibilidade de expor esse produto em temperaturas elevadas, visto que, mesmo de forma indevida, faz-se o uso dessa prática, podendo ser um risco para a saúde pública ocasionando surtos de DTA.

1.3.5 Multiplicação Microbiana

Quando uma cultura microbiana se desenvolve em um sistema fechado, o número de células aumenta. Esse fenômeno é denominado de multiplicação microbiana e permite a construção de uma curva de multiplicação típica, a qual é dividida em quatro fases: *lag*, exponencial, (log), estacionária e de declínio ou morte, como demonstrado na Figura 1 (ROSS; MCMEEKIN, 2003) .

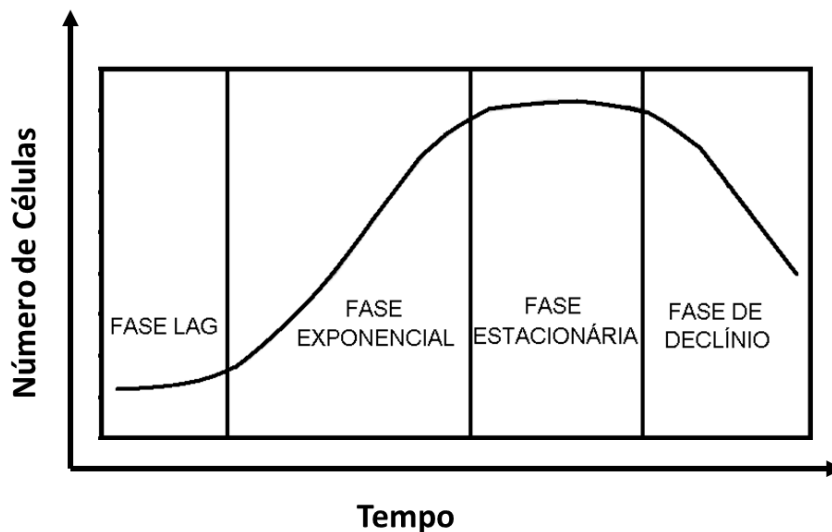


Figura 1: curva de multiplicação microbiana dividida em suas quatro fases (*lag*, exponencial, estacionária e declínio)

A fase *lag* é a fase de adaptação da célula no meio, nesse momento não há um aumento significativo da população pois as células ainda estão se adaptando. Na fase exponencial ocorre o início da multiplicação das células e aumento da população bacteriana, visto que as mesmas já estão adaptadas ao meio. O número de células cresce exponencialmente em pouco tempo, podendo

atingir doses infectantes. Na fase estacionária a multiplicação das células diminui e o número de células da população se mantém constante. O meio começa a ficar saturado, algumas células já não suportam mais o meio, e o número de células que nascem se iguala ao número de células que morrem (JAY, 2005). Por fim, há fase de declínio ou morte, onde a maioria das células estão mortas, diminuindo o número de células viáveis da população, embora uma pequena quantidade ainda esteja se dividindo. As que permanecem viáveis são consideradas como resistentes e se houver condições, voltarão a se multiplicar. Também é nessa fase onde os alimentos apresentam sinais claros de deterioração (JAY, 2005).

As curvas de multiplicação microbiana representam o desenvolvimento de microrganismos ao longo do tempo, e podem apresentar parâmetros como o número inicial de células, tempo de fase *lag*, taxa de multiplicação específica e número de células, tanto em alimentos como em meio de cultura (MALHEIROS; DE PAULA; TONDO, 2007). Estes tipos de estudo possibilitam determinar características específicas da multiplicação de um microrganismo, permitindo o entendimento do comportamento dele frente à diferentes temperaturas e substratos. Além do mais, os parâmetros cinéticos obtidos podem ser utilizados para construção de modelos matemáticos que são capazes de prever a multiplicação microbiana em condições não testadas experimentalmente. Tais procedimentos são bastante utilizados na microbiologia preditiva.

1.3.6 Microbiologia Preditiva

A microbiologia preditiva possibilita prever a resposta do comportamento de microrganismos frente às variações de fatores como temperatura, pH e condições de armazenamento, sendo uma ferramenta de grande importância para o planejamento, avaliação, otimização e controle de muitos processos na área alimentar. Com a microbiologia preditiva, o comportamento dos microrganismos (multiplicação, inativação e sobrevivência) pode ser delineado

mediante uma condição ambiental através de modelos matemáticos (ELIAS, 2014; HABERBECK et al., 2011)

Os modelos matemáticos podem ser classificados como modelos primários, secundários e terciários. Os modelos primários descrevem a dinâmica da população microbiana em função do tempo, sob determinadas condições ambientais e de cultivo, e são utilizados como parâmetros do modelo, o número inicial de células, taxa de multiplicação, tempo da fase *lag* e densidade populacional máxima (MCMEEKIN et al., 2008). Os modelos secundários descrevem a variação dos parâmetros cinéticos dos modelos primários, em função da variação de uma condição ambiental, predizendo o comportamento do sistema modelado (GUMUDAVELLI et al., 2007). Eles podem descrever a variação da taxa de multiplicação de microrganismos 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, visto que a temperatura é o principal fator que afeta a multiplicação de microrganismos e pode mudar durante o período que o alimento está sendo processado e ainda durante o armazenamento ou distribuição. Já os modelos terciários utilizam um ou mais modelos primários e secundários em *softwares* que possibilitam calcular e comparar as respostas microbianas em diferentes condições e alimentos. Esses programas facilitam a modelagem das curvas de multiplicação e inativação microbiana sob diferentes condições, sendo que alguns dos mais utilizados são os *softwares*: *Pathogen Modeling Program*, *ComBase Predictive Models*, *Food MicroModel*, *Seafood Spoilage Prefictor* (GEERAERD; HERREMANS; VAN IMPE, 2000; ROSS; MCMEEKIN, 2003).

Dentro os modos mais utilizados para avaliar a qualidade do modelo, pode-se citar o cálculo do coeficiente de determinação (R^2), o qual é uma medida geral da predição calculada pelo modelo desenvolvido, e o erro quadrático médio (RMSE), que oferece uma medida padrão de adequação de um modelo com os dados utilizados para produzi-lo (WANG et al., 2013). Os *softwares* (modelos terciários) podem simular situações similares às estudadas por uma determinada pesquisa, dessa forma suas simulações podem ser utilizadas para comparação

dos resultados entre esses estudos (SANT'ANA; FRANCO; SCHAFFNER, 2012; WANG et al., 2013)

Com os modelos matemáticos, é possível obter informações quanto ao comportamento dos microrganismos inoculados em diferentes alimentos e submetidos a temperaturas variadas, e prever em qual temperatura e qual o tempo de exposição que as preparações podem permanecer. Os modelos podem ser utilizados para prever o comportamento microbiano em sushis expostos a tempos e temperaturas de *buffets* ou outras formas de distribuição, auxiliando na segurança e qualidade desses alimentos.

Os materiais e métodos, resultados e discussão dessa dissertação serão apresentados na forma de artigo científico, o qual será apresentado a seguir.

2 CAPÍTULO 2:

Mathematical modelling and validation of *Salmonella enterica* growth in sushi exposed to different time and temperature scenarios found in real sushi establishments

Danielle Carmo da Silva, Stefani Machado Lopes, Nathanyelle Soraya Martins de Aquino, Susana de Oliveira Elias, Henrique Antunes Duda, Eduardo Cesar Tondo

Article submitted in the Food Research International - Journal

The article was formatted according to the Food Microbiology – Journal

Abstract

This study aimed modelling *Salmonella* growth in time and temperature scenarios found during sushi distribution in restaurants. Sushi distribution was evaluated in 26 Brazilian restaurants to identify time and temperature scenarios. Mathematical models to predict *Salmonella enterica* behavior at different temperatures were developed considering information obtained in restaurants. Uramaki sushi had the highest total aerobic mesophilic counts and it was chosen to develop the models. Baranyi and Roberts model was the most suitable to describe *Salmonella* growth curves, generating R^2 values of ≥ 0.98 for primary models. At 7, 15, 20, 25 and 37°C, *Salmonella* lag phase were approximately 78.0, 14.1, 7.2, 5.9 and 3.4 hours, respectively. Ratkowsky's equation was secondary model, generating R^2 of 0.99 and RMSE of 0.02. *Salmonella* growth was simulated under non-isothermal conditions, using the worst-case scenario observed in sushi establishments. Validation was performed at 36.3°C for 6h, 10°C for 24h and 29.5°C for 6h sequentially and *Salmonella* concentration reached 6.7 log CFU/g

after this incubation. The negligible growth time (ζ) for *Salmonella* was 8.9h, considering average of higher distribution temperatures of uramaki (approximately 18 °C). Based on results, we suggested for sushi distribution the temperature of $\leq 15^{\circ}\text{C}$ for 6h (maximum time of distribution allowed in Brazil).

Keywords: Japanese Food, Exposure assessment, Predictive microbiology, Salmon, Uramaki, Foodborne pathogen.

1. Introduction

Sushi is a ready-to-eat (RTE) preparation, typical of Japanese cuisine and characterized by the combination of seasoned rice and other ingredients such as ginger, vegetables, fish and fruits (De Silva & Yamao, 2006). The sushi preparation involves a lot of manipulation and the frequent use of raw ingredients, which increases the risk of microbial contamination (CDC, 2019). Different studies have reported the occurrence of foodborne outbreaks involving sushi, being the main identified causative agents *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* (CDC, 2012; CFS, 2017; Jain et al., 2008; PHSKC, 2010).

Salmonella is one of the main causes of foodborne diseases (FD) worldwide and its presence is often reported in RTE products, as fish and seafood including sushi (HEINITZ et al., 2000; LI et al., 2018). *Salmonella* can be introduced in sushi by the raw material, mainly fish, due to fecal contamination (Lyhs, 2009), or by cross-contamination from utensils and handlers' hands. Several salmonellosis outbreaks involving sushi have been reported worldwide. In Hong Kong, from 1997 until 1999, there were five outbreaks involving 15 people consuming *Salmonella*-contaminated sushi and sashimi (CFS, 2017). In Brisbane city, Oceania, in 2004, a salmonellosis outbreak was associated with the consumption of sushi rolls (Barralet, Stafford, Towner, & Smith, 2014). In the United States, in 2012, a salmonellosis outbreak affected more than 400 people

of 28 states after the consumption of raw sushi fish (CDC, 2012). In Crato city, Ceará State, Brazil, 30 people have suffered food poisoning due to the consumption of sushi contaminated by *Salmonella* in 2012 (BRASIL, 2012)

In different countries, including Brazil, it is customary to distribute sushi in buffets, increasing expressively the time of distribution. According to the Brazilian legislation on Good Hygienic Practices (GHP) for food services (BRASIL, 2004), hot foods have to be distributed in buffets at temperatures $>60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for a maximum of 6 hours, while refrigerated food, must be stored and distributed at temperatures below $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ in less than 5 days. Even though the distribution time of refrigerated food is not defined in the Brazilian legislation, normally restaurants assume that 6 hours is the maximum period use to the distributed refrigerated food, including sushi. Temperatures below $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ can compromise the sensorial quality of sushi, decreasing its consumption (SA Health, 2012). Therefore, many establishments expose sushi at room temperature for some hours, which can result in FD outbreaks, especially if sushis were prepared without adequate GHP (Lucca & da Silva Torres, 2006; Ng, Wong, Cheng, Yu, & Chan, 2013).

In Brazil, there is no national regulation concerning specifically the production and commercialization of sushi. Only in Porto Alegre (POA) city, Rio Grande do Sul, Southern Brazil, there is a regulation approving the minimum requirements for the production, preparation and marketing of sushi and sashimi. This regulation establishes that sushis must be distributed at $<5\text{ }^{\circ}\text{C}$ or at other refrigerated temperatures, since the bacterial growth be assessed considering real time and temperature scenarios. If these scenarios demonstrate that bacterial growth does not happen, these distribution conditions are considered adequate by sanitary surveillance service and can be used by the sushi restaurants. However, the analysis of bacterial growth in sushi can be expensive to the establishments and can be difficult to be monitored by the regulation officers, when sushi is exposed at different temperatures from those tested.

Thus, the aim of this study was to predict and model the growth of *Salmonella enterica* in sushi exposed to different time and temperature scenarios found in sushi establishments.

2. Materials and Methods

2.1 Identification of scenarios in sushi establishments

Visits to sushi establishments were carried out together with Official Sanitary Surveillance Service Team of the Secretary of Health of Porto Alegre city (EVA/SMS), Southern Brazil. In total, 26 sushi establishments were visited between May and December in 2018. The most usual sushi types were identified previously to the visits (Armani et al., 2017; Girard & Mariojouis, 2008; Verbeke, Vermeir, & Brunsø, 2007) and they were chosen to be monitored at each establishment. They were: nigiri (a combination of seasoned rice with a thin layer of raw salmon), uramaki (raw salmon wrapped in cream cheese, dehydrated seaweed, seasoned rice and sesame) and hosomaki (raw salmon, wrapped in seasoned rice and dehydrated seaweed). Temperatures of the selected sushi types at distribution in buffet were collected through K-type thermocouples and recorded using a data logger (Tenmars, Taiwan) inserted in the geometric center of the fish of each sushi. From each establishment, pieces of raw salmon and the three types of sushi were collected in triplicate to determine the pH of the whole sushi pieces and its ingredients separately, i. e. the seasoned rice, seaweed and fish. The pH was measured using a pH meter model Q400A (Quimis®, São Paulo, Brazil). Each sushi piece was tested for total aerobic mesophilic counts according to the methods as described in subsection 2.2.3 in order to identify the most contaminated sushi type, which was used to develop the mathematical model.

2.2 Development of the mathematical model

Due to the total aerobic mesophilic counts found in this study (subsection 3.3), uramaki sushi was the most contaminated sushi type that may be due to greater manipulation and thus it may increase the possibility of pathogens presence, for this reason it was chosen to be used in the development of the mathematical model. Then, the most contaminated sushi type was chosen in order to represent the worst-case scenario. Uramaki samples were collected in establishments and were tested for *Salmonella* presence. Control samples demonstrating typical *Salmonella* colonies (black colonies due to the production of H₂S) on Xylose Lysine Deoxycholate agar plates (XLD, Merck, Darsmtadt, Germany), these microorganisms were tested by proteomic analysis by Laser Assisted Matrix and Flight Time Desorption / Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS), model Biotype 4.0, MBT OC software (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) at the Institute of Basic Health Sciences (ICBS) of UFRGS and *Salmonella* positive samples were not used. Uramaki sushi was prepared in the laboratory in order to ensure the hygienic-sanitary quality of sushi pieces, once the *Salmonella* presence could interfere in multiplication of inoculated *Salmonella* strains.

2.2.1 Preparation of *Salmonella* inoculum

Five *Salmonella* enterica serotypes were selected to compose a pool: *S. Minnesota* and *S. Heidelberg* (isolated from poultry), *S. Typhimurium* L12031, *S. Enteritidis* 55507 and *S. Enteritidis* SE86 (isolated from foods involved in FD outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Brazil). All serotypes were grown separately in 5 ml of Brain Heart Infusion Broth (BHI; Merck, Darsmtadt, Germany) incubated at 37 °C for 18-24 h. After incubation, 1 ml BHI broth containing each serotype was used to compose 5 ml *S. enterica* pool. This pool was centrifuged (3500 RPM, 10 min, 4 °C) (CIEN TEC CT-5000R, Brazil), the supernatant was discarded, and the pellet was washed three times with sterile 0.1% peptone water (w/w) (Merck, Darsmtadt, Germany). Finally, cells were suspended in 0.1% peptone water (w/w) and the final cell concentration was 10⁸

CFU/ml, adjusted by optical density (OD_{630nm}) using Ultrospec 3100™ pro (Amersham Biosciences, United Kingdom) and confirmed by plating on XLD agar (Merck, Darmstadt, Germany). Serial decimal dilutions were carried out in 0.1% sterile peptone water (w/w) and an aliquot was used to artificially contaminate uramaki pieces used for the *Salmonella* model experiments as described in the subsection 2.2.2.

2.2.2 Sushi preparation, inoculation and incubation of sushi pieces

Uramaki sushi pieces were prepared using salmon (*Salmo salar*) fillet, rice (Minami Mai, Santa Maria, Brazil), rice seasoning (potable water, vinegar, sugar and salt pH 3.14, Azuma, Jundiaí, Brazil), dehydrated seaweed (Nori Ariake, Japan), cream cheese (Philadelphia, Curitiba, Brazil) and black and white sesame. All ingredients were purchased from a local market in Porto Alegre city.

Uramaki sushi samples were prepared in the Laboratory of Food Microbiology and Food Control of Institute of Food Science and Food Technology of Federal University of Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). First, the sushi rice was prepared using 150g of raw rice, which were washed five times with running potable water, using a sieve. Then, it was soaked in 200ml of potable water for 30 min and cooked inside a pan for about 30 min. After cooking the rice was rested for 10 min. Cooking was performed according to the rice manufacturer's instructions. After rest, the rice was mixed with 10 ml of sushi seasoning, reaching a pH of approximately 4.0, as recommended by the Porto Alegre city regulation and other regulations (pH ≤ 4.6) (BRASIL, 2016; Manitoba Health, 2013; NSW, 2008). After the seasoning, the rice was cooled to room temperature.

Sushi rolls were made as follows: inside a laminar flow cabinet and using a bamboo mat covered by a plastic film, half of a dehydrated seaweed sheet (cut with a sterile knife) was positioned with the rough side up. Sterile distilled water was placed inside a sterile 500ml Becker flask and used to moisten the hands during preparation and to facilitate molding of the seasoned rice. Approximately

70g of seasoned rice were spread on the seaweed by hand. Using a sterile spoon, approximately 10g of the white and black sesame mixture was spread over rice. After, the mixture was turned upside down, under the bamboo mat, showing the smooth side of the seaweed. In the center of the seaweed, approximately 15g of cream cheese were added and spread using a sterile spoon, forming a thin layer, which was covered by a layer of 50g-salmon fillet. Finally, the sushi roll was carefully closed by hand, from the side containing the fish, using the bamboo mat. The uramaki sushi rolls were then cut into eight equal-size-pieces, using a sterile knife. Each piece had approximately 20g, pH 4.8 (model Q400A-Quimis®, Sao Paulo, Brazil) and water activity 0.98 (AquaLab 3TE-Decagon, Pullman, USA). Control samples (without inoculation) were tested for *Salmonella* and presented negative results. Each uramaki sample was placed in a sterile plastic bag in order to be artificially inoculated. For that, 1 mL of the *Salmonella* pool (2-3 log CFU/mL) was added to the upper side of each sushi piece sample and let for 5 minutes to absorb. Inoculated samples were incubated at different temperatures in a biochemical oxygen demand incubator model SL-200 (Solab, Piracicaba, Brazil). For model development purposes, inoculated samples were incubated at 7, 15, 20, 25 and 37 °C until *Salmonella* reached the stationary phase.

2.2.3 Bacterial enumeration

At defined time intervals, according to incubation temperatures, three uramaki units were taken from the incubator chamber and each sample unit was mixed with approximately 180 mL of 0.1% sterile peptone water (w/w). Samples were homogenized in a stomacher (Stomacher® 400, Seward, England) for two min. Then, serial dilutions were carried out and aliquots of the dilutions were seeded on XLD agar plates (Merck, Darsmtadt, Germany). Samples stored at temperatures below 15 °C on XLD plates were added of a thin layer of Tryptic Soy Agar (TSA, KASVI, Italy), according to the one-step TAL method report by Kang and Fung (2000). This method was used to recover possible injured

Salmonella cells due to incubation at low temperatures (7 and 15 °C). *Salmonella* counts were carried out after 24-48h of incubation and expressed as log CFU/g. The detection limit was 100 CFU/g. When increased sensitivity was required, 1000µL of the first dilution was plated on 3 XLD and XLD-TSA agar plates (300, 300 and 400µL by plate). Sushi Total Aerobic Mesophilic counts were also carried out on Plate Count Agar plates (PCA, Merck, Darsmtadt, Germany), incubated at 37 °C for 24-48h.

2.2.4 Primary and secondary models

For each storage temperature, the growth curves of *Salmonella enterica* in uramaki were constructed separately. The experimental data were adjusted to the DMFit tool using the ComBase software (browser.combase.cc/DMFit.aspx). All curves presented the expected microbial growth behavior. Therefore, the model described by Baranyi and Roberts (1994) (equations (1), (2), (3)) was used to calculate the kinetic growth parameters of *S. enterica* in sushi, such as: maximum growth rate (μ_{max}), time of lag phase (λ), and maximum population density (N_{max}).

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

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

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

where: $\ln(N(t))$ = cell concentration at time t [h] (CFU/g); $\ln(N_0)$ = initial population concentration (CFU/g); μ_{max} = maximum specific growth rate (log CFU/g/h);

$\ln(N_{max})$ = maximum population concentration (CFU/g); q_0 [-] (dimensionl) = parameter expressing the initial physiological state of cells; λ =lag time (h).

The growth rates (μ_{max}) obtained from the primary models for each temperature were adjusted to develop the secondary models. The square root equation described by Ratkowsky et al. (1982) was used to describe μ as a function of the temperature variation (Eq. (4))

$$\sqrt{\mu_{max}} = a(T - T_0) \quad (4)$$

where: $\sqrt{\mu_{max}}$ is the square root of maximum specific growth rate, a is the regression coefficient of the square root of growth rate constant versus temperatures below the optimal temperature, T (°C) is temperature and T_0 (°C) is a conceptual minimum temperature for microbial growth.

2.2.5 Model validation

The ability to predict *Salmonella* growth in uramaki sushi at non-isothermal temperatures was performed using the secondary model results, considering the worst-case scenario observed at the visits to the establishments. The scenario was built considering the temperatures collected during the distribution of sushi in establishments, the temperatures of Porto Alegre city and the time of food exposure in the country, according to the legislation (BRASIL, 2004). The assay was conducted first at 36.3 °C (representing the average of the highest temperatures of the last five summers in Porto Alegre city) for 6 hours (maximum exposure time allowed for food distribution in Brazil (BRASIL, 2004)), followed by 10 °C (refrigerator temperature observed during some visits), for 24 hours (considering the re-use of the sushi in the next day, which is not allowed by Brazilian regulation but can be done by irregular establishments) and, finally, at 29.5 °C (average between the highest and lowest temperatures of the last 5 summers in Porto Alegre city) for 6 hours. Meteorological data for environmental

temperatures were obtained from the National Institute of Meteorology from December to March 2014 to 2019 (INMET, 2019). Uramaki sushi pieces were prepared and inoculated with the *S. enterica* pool as described in subsection 2.2.2. The contaminated sushi pieces were then stored under these non-isothermal conditions and counts were carried out as described in subsection 2.2.3. Sampling was performed throughout the storage period in the following intervals: 0, 2, 4, 6, 9, 23, 29, 31, 33 and 35 hours.

The growth of *S. enterica* under non-isothermal conditions was modeled by applying a set of differential equations as described by Baranyi et al. (1995) in Equations (5) and (6):

$$\frac{dq}{dt} = \mu_{max}q, \quad q(0) = q_0 \quad (5)$$

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} \frac{q}{1+q} \left(1 - \frac{N}{N_{max}}\right) N, \quad N(0) = N_0 \quad (6)$$

where: μ_{max} is the maximum specific growth rate, N_{max} is the maximum population concentration, N_0 is the initial population concentration, q_0 and q (dimensionless) are the amounts related to the critical compounds needed for growth and depict the physiological state of the cells in the instant of inoculation and later period, respectively.

The growth rate model shown, represented by Equation (4) has been replaced in Equations (5), (6), with all differential equation parameters being temperature dependent. The differential equation was solved using Dormand-Prince's Runge-Kutta (4,5) method, available in the MATLAB® R2018a version (Mathworks, Natick, USA). This allowed to estimate the population concentration of *S. enterica* under non-isothermal exposure of sushi.

2.3 Calculation of the parameter negligible growth time (ζ)

To determine the maximum time and temperature at which sushi can be safely distributed, the negligible growth time parameter (ζ) was used, as described by De Oliveira Elias (2018). The ζ is the lag phase period of a microorganism present in a determined food exposed to a determined temperature, plus the time necessary to microorganism increase its numbers in 0.5 log CFU/g. This period was considered safe for the exposure of sushi. The ζ was calculated for the five temperatures tested experimentally and to determine the temperature in the maximum time allowed by Brazilian federal law (six hours), through Equations (7-10). In order to calculate ζ , 0.5 log CFU/g were transformed in ln CFU/g and applied in Equation 1, where the variable Time was isolated.

$$\zeta = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \left[\left(\frac{k\Delta x - \Delta x}{k - \Delta x} \right) \left(\frac{1+q_0}{q_0} \right) - \frac{1}{q_0} \right] \quad (7)$$

$$\Delta x = e^{\Delta y} \quad (8)$$

$$k = e^{y_{max} - y_0} \quad (9)$$

$$q_0 = \frac{1}{e^{\lambda \mu_{max}} - 1} \quad (10)$$

where: ζ negligible growth time [h]; μ_{max} = maximum specific growth rate (ln CFU/g/h); Δx [-] = linear growth ratio; Δy = the growth limit (ln CFU/g); y_{max} = the maximum population (ln CFU/g); y_0 = the initial population (ln CFU/g); q_0 [-] = parameter expressing the initial physiological state of cells; λ = lag time (h).

2.4 Statistical analysis

The distribution temperatures and the pH of the parts and components of the three types of sushi and raw salmon in the visited establishments were

verified for significant differences ($p \leq 0.05$), using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test using SAS Studio® online software. The total aerobic mesophilic count parameters of the collected sushi were also compared to each other, with the same significant differences and by the same test, using the Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS version 21.0, Chicago, IL). The fit of the models was evaluated by the coefficient of determination (R^2). Its performance was verified by the mean square error (RMSE). Bias and Accuracy were calculated to evaluate the predictive capacity of the proposed non-isothermal models. Equations 11 and 12 represents Bias and Accuracy factors, respectively, where μ_{\max} predicted and μ_{\max} observed are the values of growth rate estimated by the predictive model and obtained in the experiments, correspondingly, and n is the number of data points used for the calculations of both factors. In addition, ComBase Predictor was used for further comparison with the data generated in this study, using pH of 4.8, water activity of 0.988 (values cited in subsection 2.2.2) and the physiological state parameter was not altered.

$$\text{Bias factor} = 10^{(\sum \log(\mu_{\max \text{ predicted}} / \mu_{\max \text{ observed}}) / n)} \quad (11)$$

$$\text{Accuracy factor} = 10^{(\sum |\log(\mu_{\max \text{ predicted}} / \mu_{\max \text{ observed}})| / n)} \quad (12)$$

where: $\mu_{\max \text{ predicted}}$ (1/h) is the maximum specific growth rate predicted, $\mu_{\max \text{ observed}}$ (1/h) is the maximum specific growth rate observed, n is the number of observations.

3. Results and discussion

3.1 Distribution temperature scenarios of sushi establishments

In general, the temperatures of different sushi types during its distribution presented values around 18 °C, varying from 4.9 to 25.9 °C. The mean temperatures of different types of sushis did not vary significantly. The temperature data collected by us are similar to those obtained in the study of the Australian Capital Territory, where 45 pieces of sushi demonstrated an average temperature of 15 °C, ranging from 5 °C to 25 °C (Barralet et al., 2014). The highest temperatures observed in our study did not differ in the three types of sushi, and it ranged from 9.3 °C to 25.9 °C. Similarly, the averages of the lowest temperatures collected in the three types of sushi did not demonstrate significant differences, presenting values around 15 °C. Based on these results and on those found in scientific references, we can assume that it is difficult to find sushi distributed at temperatures below 5 °C. This can be explained by the difficulty to keep sushi at temperatures <5 °C at distribution in buffets, inadequate functioning of cooling equipment or due to the choice of establishments in not refrigerating sushi during its distribution in order to maintain its sensory quality (SA Health, 2012).

The temperatures of the environment where sushis were distributed, in this study, it was considered the temperature measured by K-type thermocouples close but not touching the cooling surface of the distribution equipment. The results did not present significant differences between the average temperature (approximately 23 °C) of the environment near equipment and the three types of sushi. The temperatures of the refrigerated environment observed ranged from 8.6 °C to 28.5 °C. Similar temperatures were found in other studies. For example, according to data reported by the Australian government, sushi exhibitors had average temperatures of 9.6 °C up to 19.8 °C (NSW, 2008). Barralet et al. (2014) found the internal temperatures of sushi exhibitors ranging from 17 °C to 24 °C. The same study reported that 13 people were involved in a sushi-related outbreak of Salmonellosis, and long-term exposure temperatures of sushi may be related

to the outbreak. One explanation for the temperature range of exhibitors found in our study and those of other authors, ranging from 8 °C to 28 °C, may be due to the difference in refrigerant efficiency in heat transfer of distribution equipment.

In our study, 88.4 % of the buffets had cooling equipment for sushi distribution as a consequence of the sanitary regulation in Brazil (BRASIL, 2004). Among them, 60.8 % did not have the validation of bacterial growth in sushis exposed to temperatures above 5 °C. These results showed that although the sushi establishments had the option to use temperatures for the distribution of sushi higher than 5 °C since the bacterial growth in sushi were validated, the validation is not done in most cases.

3.2 pH

The average pH of sushis and their main ingredients are presented in Table 1. No significant differences in pH values were found among nigiri, uramaki and hosomaki (approximately 4.5), however a significant difference between the average pH of raw salmon (not yet used in sushi) and these three types of sushi was observed. The average pH of raw salmon was approximately 6.1, ranging from 5.4 to 6.5. These pH values indicate freshness of fish tested (pH <7.0) (BRASIL, 2017) and they are in agreement with fish tested in other studies (Miguéis, Santos, Saraiva, & Esteves, 2015; Muscolino et al., 2014; Rodrigues et al., 2012). Interestingly, the salmon used in sushis had pH values of approximately 4.7, which represents a pH decreasing of around 1.5 when compared to raw salmon not yet used in sushi. This pH difference can be explained by the direct contact of salmon with seasoned rice, resulting in the pH reduction. The effect of lowering fish pH may influence the microbial multiplication, however it did not completely inhibited *Salmonella* growth as shown in subsection 3.4.1.

As expected, hosomaki sushi (pH 4.5) and uramaki sushi (pH 4.8) had the largest salmon pH reductions, and this can be explained, in the case of hosomaki,

by the high surface contact of salmon and seasoned rice (pH 3.9). In the case of uramaki, it can be explained by the higher proportion of salmon in contact with porous seaweed (pH 4.3) which allowed transfer of acidic compounds (vinegar) from seasoned rice (pH 3.7) to salmon. However, nigiri sushi presented lower pH reduction of salmon (pH 5.0) with significant difference in relation to hosomaki and uramaki. This result is probably due to the nigiri's assembly structure, where only one side of the salmon is in contact with seasoned rice, on the contrary the other two types, where salmon is surrounded by acidic ingredients. Hoel et al. (2018) also verified the pH reduction of raw salmon (pH 6.2) when placed on top of the acid rice (pH <4.6) in nigiri, observing a reduction of approximately 0.3 in pH.

Table 1: pH values of nigiri, uramaki, hosomaki, and its ingredients separately measured

pH	Nigiri	Uramaki	Hosomaki	Raw Salmon*
Whole				
sushi pieces	4.4±0.3 ^a	4.5±0.3 ^a	4.4±0.3 ^a	-
Seasoned Rice	3.7±0.1 ^b	3.8±0.1 ^b	4.0±0.1 ^a	-
Seaweed	-	4.3±0.1 ^a	4.3±0.2 ^a	-
Salmon in sushi	5.0±0.3 ^b	4.8±0.2 ^{bc}	4.2±0.3 ^c	6,1±0.4 ^a

*Raw Salmon=salmon out of sushi.

Tukey test $p \leq 0.05$.

3.3 Microbiological results

The results of the total aerobic mesophilic counts in nigiri, uramaki, hosomaki and raw salmon are demonstrated in Figure 1. Uramaki sushi demonstrated the largest microbiological contamination, ranging from 3.5 – 6.7 log CFU/g. These numbers represent significant differences when compared to nigiri and hosomaki, which demonstrated counts ranging from 3.2 -5.4 and 3.6 - 5.3 log CFU/g, respectively. Salmon had counts between 3.4 and 5.5 CFU/g. Similar results concerning aerobic mesophilic counts in sushi were found by several authors in different countries, and the values ranged from 5.0 to 8.5 CFU/g (SUNNIVA Hoel, Mehli, Bruheim, Vadstein, & Jakobsen, 2015; Kulawik, Dordevic, Gambuś, Szczurowska, & Zając, 2018; Muscolino et al., 2014; Tirloni, Bernardi, Gandolfi, Cattaneo, & Stella, 2017). The wide variation in microbial contamination of sushi observed in these studies can be explained by the different contamination levels of ingredients and by the Good Hygienic Practices (GHP) during preparation.

In the present study, sushi and salmon sampled in all establishments visited had counts greater than 3 log CFU/g, and some samples reached 6.6 log CFU/g. In Brazil, the legislation that establishes food microbiological limits (BRASIL, 2001) does not have parameters concerning total aerobic mesophilic counts in sushi, however, according to CFS (2007), which provides microbiological limits for ready-to-eat foods in Hong Kong, sushi containing fish must have a maximum of 6 log CFU/g to be considered for consumption. In the present study, it was verified that uramaki was higher contaminated than the other types of sushi, what may be due to the major cross-contamination from handling (for example, by cutting fish and forming the sushi rolls), utensils or ingredients used when compared to the others.

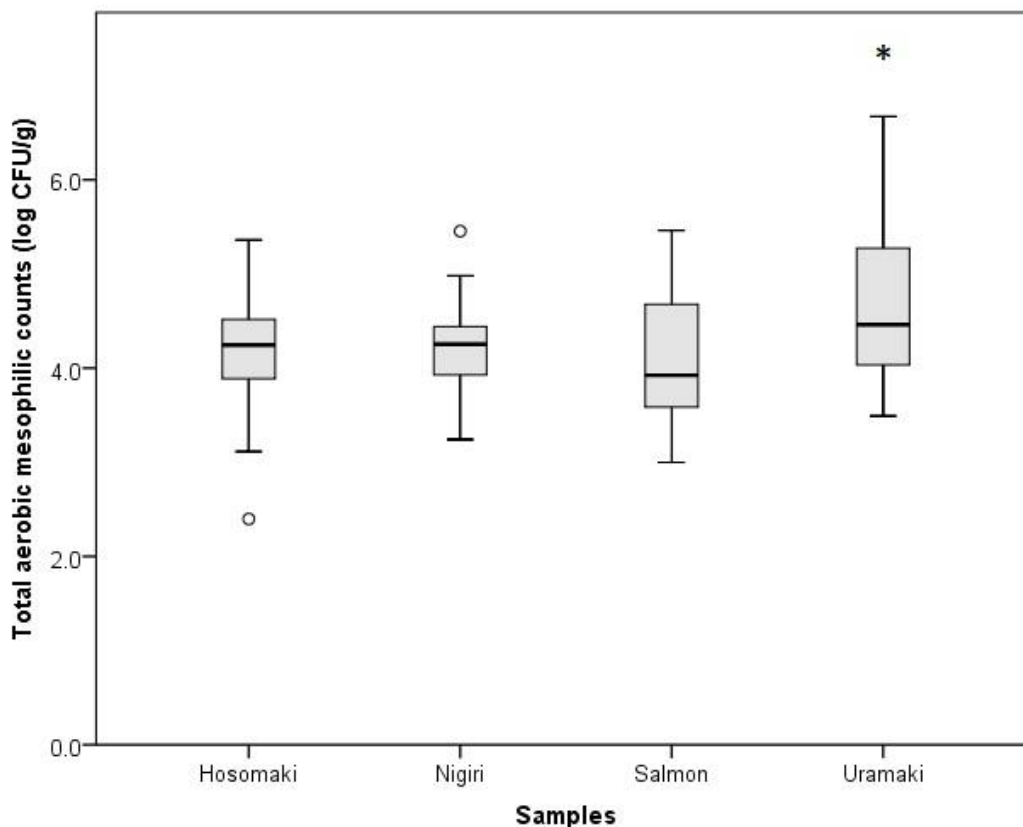


Figure 1: Total aerobic mesophilic counts of hosomaki, nigiri, uramaki, and salmon of the establishments visited, analyses were performed in triplicate. Each block represents the total count variation of the pieces in the establishments. Tukey test ($p \leq 0.05$) * shows significant differences.

3.4 Mathematical modelling

3.4.1 Growth Modelling of *Salmonella enterica* in sushi under isothermal conditions

Due to the uramaki sushi was the most microbiologically contaminated, this type of sushi was used to develop the mathematical models, representing the worst-case scenario. All *S. enterica* multiplication curves in sushi started with initial concentrations of approximately 2.5 log CFU/g. At temperatures of 15, 20 and 25 °C, final concentrations of *Salmonella* reached almost 7 log CFU/g after 212, 85 and 75 hours, respectively (Figure 2). At 7 °C, after 450h, the final

concentration of *Salmonella* reached almost 4 log CFU/g after 450h, while at 37 °C, the optimal growth temperature of this food pathogen, the counts reached approximately 8.5 log CFU/g, after 36h. The growth curves of *S. enterica* obtained in DMFit at all temperatures presented high correlation coefficient ($R^2 > 0.99$), thus a good fit between the experimental data and Baranyi model (1994) was observed.

The primary growth parameters (growth rate, lag phase time and maximum population density) of the sushi models were compared with those predicted by Combase (Table 2). In general, the values of primary *Salmonella* sushi models were similar to those predicted by Combase. Regarding the growth rate, the *Salmonella* sushi models presented higher values for all temperatures tested, being the greatest difference observed at 37 °C. Primary models of *Salmonella* in sushi obtained shorter lag phase than those predicted by the Combase program. The maximum population densities of all predicted values were higher than those calculated using the experimental data.

Growth rate values obtained by primary models were used to develop the secondary model (Table 3), which allowed the prediction of growth rate according to temperature variation. The secondary model presented R^2 and RMSE of 0.99 and 0.02, respectively, demonstrating adequacy, and the model was able to predict *S. enterica* growth in uramaki sushi exposed at temperatures from 7 to 37 °C.

Although the uramaki sushi was prepared inside a food microbiology laboratory using conditions as aseptic as possible, all the sushi pieces prepared had natural microbiota and this was chosen by us in order to test as close as possible the reality of sushi and the development of *Salmonella* in worst-case scenarios. Some predictive studies develop models using culture media or food matrixes without its natural microbiota, however it may lead to an overestimation of the growth rates of inoculated microorganisms (Sunniva Hoel et al., 2018), which may not represent the real conditions in food production. The total aerobic mesophilic counts values of the inoculated uramaki were enumerated along with

those of *Salmonella* at each time interval. The natural microbiota counts of sushi pieces were higher than *Salmonella* population, reaching up to 9.5 log CFU/g at 37 °C. In addition, at 15 and 20 °C, the lag phases were 10.9 ± 7.8 and 4.3 ± 4.6 hours, respectively, while the maximum population density were 7.9 ± 0.2 and 8.1 ± 0.1 log, respectively.

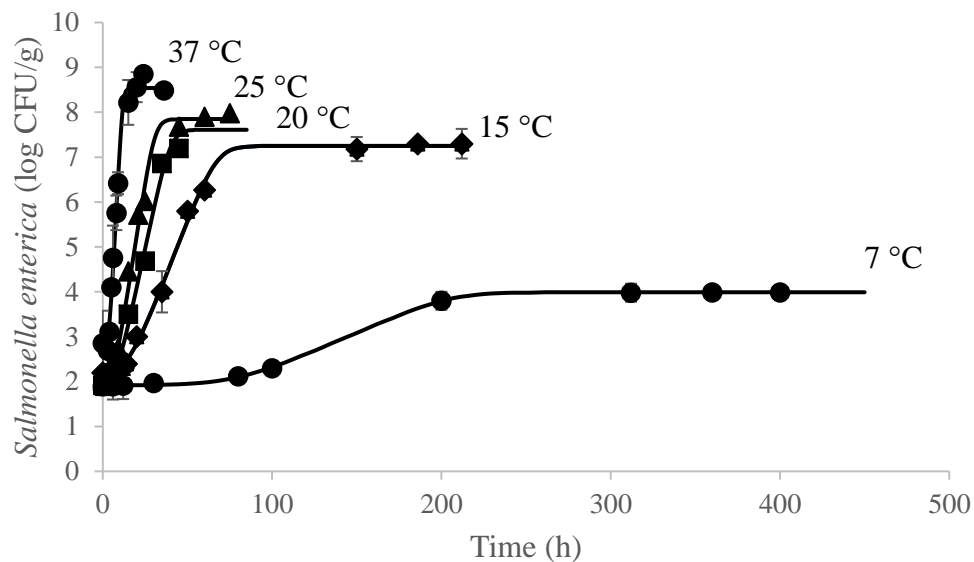


Figure 2: Primary models obtained by growth of *Salmonella enterica* in sushi exposed at isothermal temperatures (7, 15, 20, 25 and 37 °C), experimental data fitted in DMFit/ComBase. Each point represents an average of triplicate results.

Table 2: Parameters of primary models (maximum growth rate, lag time and maximum population density (N_{max}) of *Salmonella enterica* inoculated in sushi and predicted by Combase Broth Models at isothermal temperatures.

Temperature (°C)	Growth rate (log CFU/g/h)		Lag time (h)		N_{max} (log CFU/g)		R^2
	Sushi	ComBase	Sushi	ComBase	Sushi	ComBase	
7	0.01 ± 0.000	0.006	78.02 ± 2.09	238.86	3.99 ± 0.00	8.52	0.995
15	0.09 ± 0.005	0.041	14.06 ± 2.20	34.96	7.30 ± 0.30	8.52	0.996
20	0.17 ± 0.014	0.102	7.25 ± 1.87	14.05	7.89 ± 0.00	8.52	0.993
25	0.24 ± 0.020	0.203	5.95 ± 1.69	7.06	7.98 ± 0.54	8.52	0.980
37	0.69 ± 0.078	0.417	3.37 ± 0.69	3.44	8.49 ± 0.00	8.52	0.988

R^2 is coefficient of determination.

Table 3: Secondary model obtained from growth rate of *Salmonella enterica* growing in sushi exposed under isothermal temperatures

Secondary model	R^2	RMSE
$\sqrt{\mu_{max}} = 0.023(T - 1.852)$	0.99	0.02

R^2 is coefficient of determination.

RMSE is root mean square error.

μ_{max} is maximum specific growth rate (log CFU/g/h).

T is temperature (°C).

3.4.2 Model validation

The developed *Salmonella* enterica sushi model was used to predict the pathogen behavior in the worst-case scenario of sushi distribution as described in subsection 2.2.5. This experiment was carried out in order to validate the model built at non-isothermal temperatures (Figure 3). The initial *Salmonella* concentration started around 2 log CFU/g and ended at almost 7 log CFU/g after 36h of storage at different temperatures. The first time-temperature binomial (6h - 36.3 °C) increased *Salmonella* concentration in approximately 3 log CFU/g. The second binomial (24h - 10 °C) increased around 0.5 log CFU/g. Finally, the last period (6h - 29.5 °C) was able to increase approximately 0.6 log CFU/g. These results demonstrated that time and mainly temperature abuses result in growth of *Salmonella* until elevate levels in sushi (Figure 3).

The non-isothermal growth model of *S. enterica* in uramaki presented an R^2 of 0.97 and an RMSE of 0.06. Similarly, Wang et al. (2017) developed a model to predict bacterial growth at dynamic temperatures using a numerical solution with the fourth order Runge-Kutta method and demonstrated that the developed model could predict the growth of *Staphylococcus aureus* in rice cake, with an RMSE of 0.21. Bias and Accuracy were also calculated in the present study, the values were 0.97 and 1.03, respectively. Therefore, the model developed in this study is adequate to predict the behavior of *S. enterica* in sushi.

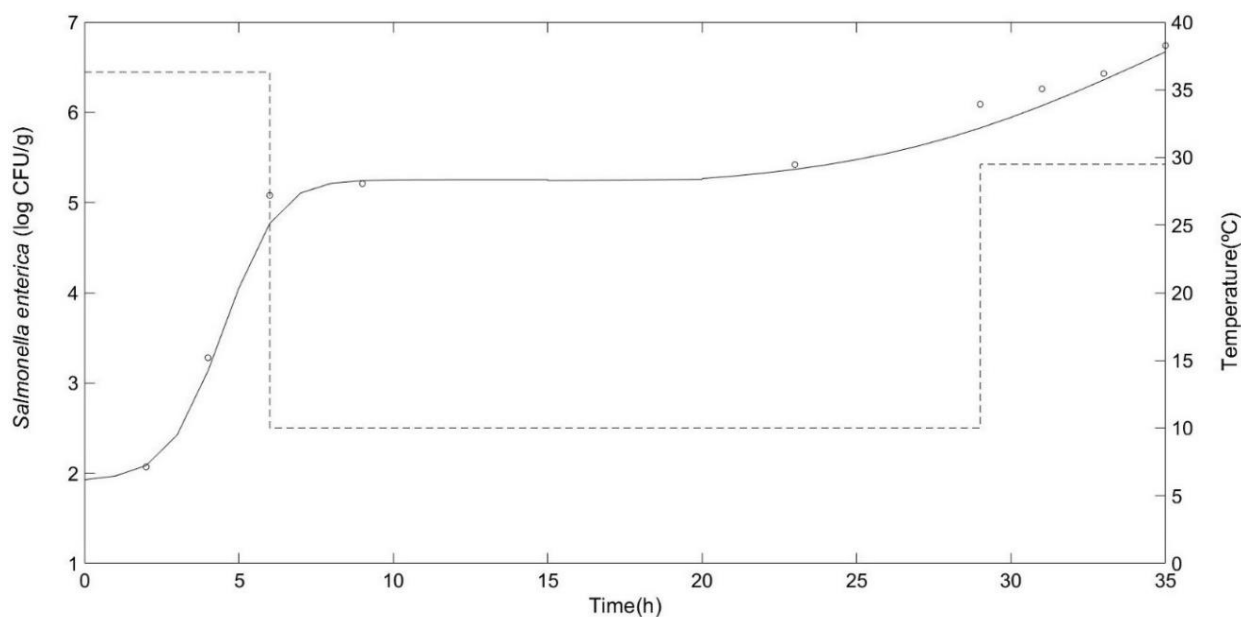


Figure 3: Validation of the growth models developed to *Salmonella enterica* in sushi under non-isothermal conditions. Dashed line represents the temperature, from 0 to 6h (36.3 °C), 6h to 29h (10 °C) and 29 to 35h (29.5 °C) sequentially. The points are the concentrations of *S. enterica* experimentally obtained under non-isothermal temperatures and the straight line is the mathematical model predicted in Matlab software.

3.5 Negligible growth time (ζ) parameter to *Salmonella enterica* in sushi

The negligible growth time parameter (ζ) values are shown in Table 4. As expected at lower temperatures, such as at 7 °C, the ζ was higher (83h). Similar values were found for *Salmonella* on lettuce by De Oliveira Elias (2018) (80.5h at 5 °C). In the present study, when sushi was stored at 15 °C, the ζ decreases to 12.8h. At 18 °C (the average of the higher distribution temperatures of uramaki pieces) the ζ was 8.9h. The maximum temperature for distribution of an uramaki contaminated with *Salmonella* was calculated for six hours of exposure, i.e. the maximum period allowed for a food to be distributed at controlled conditions by the Brazilian legislation (BRASIL, 2004). The results demonstrated that uramaki could be distributed for six hours at 23.7 °C to finally sustain some *Salmonella*

growth not considered negligible. Recently, Gomes Alfama et al., (2019) also verified the growth of *Salmonella* in several foods distributed in buffet for a period of 6 hours and found that at 21 °C the growth of this pathogen was insignificant, which corroborates the results found in our study.

Although the results of *Salmonella* demonstrated that uramaki could be distributed at 23.7 °C for 6 hours, the total mesophilic counts in uramaki demonstrated that at 20 °C, the lag phase was 4.3 ± 4.6 hours. However, at 15 °C, the negligible growth time parameter (ζ) was 12.8h and the lag phase was 10.9 ± 7.8 . Based on these results, as a safety measure, we suggested that this type of sushi could be distributed at ≤ 15 °C for the maximum time of distribution allowed in Brazil (6 hours).

Table 4: Negligible growth time (ζ) parameter (h) calculated to *Salmonella enterica* in sushi.

Temperature (°C)	Time (h)
7	83
15	12.8
18	8.9
20	7.3
23.7	6
25	4.8
37	3.3

4. Conclusion

The present study showed that there was no significant difference in nigiri, uramaki and hosomaki temperatures during distribution, indicating that a single time and temperature binomial could be used as parameters for sushi distribution. The acidic pH of sushi rice reduced the pH of fish used in sushi, indicating that it can influence in the microbial multiplication in sushi. However, the seasoned rice (≤ 4.6) did not completely prevent the growth of *S. enterica* and the accompanying microbiota of sushi exposed to temperatures between 7 and 37 °C. Among the analyzed sushi, uramaki was the one which had the higher average mesophilic counts, indicating to be the most contaminated. Therefore, to ensure the microbiological safety of this preparation it is importance to control the Good Hygienic Practices (GHP) during preparation, and to control the time and temperature binomial at the distribution on the sushi counter. The proposed model obtained 97.1 % confidence (97% of the predicted values were in agreement with those observed), being adequate to evaluate the growth of *S. enterica* in sushi exposed between 7 and 37 °C. The ζ identified time and temperature binomials for various sushi distribution scenarios and it can be used for a safe sushi distribution. Based on the results we suggested that the binomial of 6 hours at ≤ 15 °C can be used to distribute uramaki sushi.

Acknowledgments

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

5. References

Armani, A., Tinacci, L., Lorenzetti, R., Benvenuti, A., Susini, F., Gasperetti, L., ... Guidi, A. (2017). Is raw better? A multiple DNA barcoding approach (full and mini) based on mitochondrial and nuclear markers reveals low rates of misdescription

in sushi products sold on the Italian market. *Food Control*, 79, 126–133. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2017.03.030>

Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 277–294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)

Baranyi, J., Robinson, T. P., Kaloti, A., & Mackey, B. M. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 27(1), 61–75. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00154-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00154-X)

Barralet, J., Stafford, R., Towner, C., & Smith, P. (2014). Outbreak of *Salmonella* Singapore associated with eating sushi. *Communicable Diseases Intelligence*, 28, 527–528. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/7989507_Outbreak_of_Salmonella_Singapore_associated_with_eating_sushi

BRASIL. Resolução RDC no 12, de 02 de janeiro de 2001 (2001). Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BRASIL. Resolução RDC no 216, de 15 de setembro de 2004 (2004). Brasil: Agência Nacional da Vigilância Sanitária.

BRASIL. (2012). Bactéria em sushi de supermercado no Cariri causou infecção, diz laudo. Retrieved August 14, 2019, from <http://g1.globo.com/ceara/noticia/2012/05/bacteria-em-sushi-de-supermercado-no-cariri-causou-infeccao-diz-laudo.html>

BRASIL. Portaria no 1109, de 23 agosto de 2016 (2016). Brasil: Diário Oficial Porto Alegre.

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

CDC. (2012). Multistate Outbreak of *Salmonella* Bareilly and *Salmonella* Nchanga Infections Associated with a Raw Scraped Ground Tuna Product (Final

Update). Retrieved June 25, 2019, from <https://www.cdc.gov/salmonella/bareilly-04-12/index.html>

CDC. (2019). Sushi Safety. British Columbia. Retrieved from [http://www.bccdc.ca/resource-gallery/Documents/Educational Materials/EH/FPS/Fish/SushiSafety.pdf](http://www.bccdc.ca/resource-gallery/Documents/Educational%20Materials/EH/FPS/Fish/SushiSafety.pdf)

CFS. (2007). Microbiological Guidelines for Ready-to-eat Food. Hong Kong. Retrieved from [http://www.cfs.gov.hk/english/whatsnew/whatsnew_act/files/MBGL_RTE food_e.pdf](http://www.cfs.gov.hk/english/whatsnew/whatsnew_act/files/MBGL_RTE_food_e.pdf) .

CFS. (2017). Sushi and Sashimi in Hong Kong. Hong Kong. Retrieved from https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/programme_rafs_fm_01_09_sshk.html

De Silva, D., & Yamao, M. (2006). A yen for sushi: an analysis of demographic and behavioural patterns of sushi consumption in Japan. *Journal of Foodservice*, 17, 63–76. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4506.2006.00021.x>

Elias, S., Noronha, T. B., & Tondo, E. C. (2018). Assessment of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 growth on lettuce exposed to isothermal and non-isothermal conditions. *Food Microbiology*, 72, 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.016>

Girard, S., & Mariojous, C. (2008). What is the demand for farmed fish on the European markets? IIFET 2008 Vietnam Proceedings. Vietnam. Retrieved from https://ir.library.oregonstate.edu/concern/conference_proceedings_or_journals/9c67wn70r

Gomes Alfama, E. R., Hessel, C. T., Elias, S., Pinto Magalhães, C. R., Terra Santiago, M. F., Anschau, M., & Tondo, E. C. (2019). Assessment of temperature distribution of cold and hot meals in food services and the prediction growth of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 106, 106725. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106725>

Heinitz, M. L., Ruble, R. D., Wagner, D. E., & Tatini, S. R. (2000). Incidence of *Salmonella* in Fish and Seafood. *Journal of Food Protection*, 63(5), 579–592. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.5.579>

Hoel, S., Mehli, L., Bruheim, T., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2015). Assessment of Microbiological Quality of Retail Fresh Sushi from Selected Sources in Norway. *Journal of Food Protection*, 78(5), 977–982. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-480>

Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2018). Growth of mesophilic *Aeromonas salmonicida* in an experimental model of nigiri sushi during cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.07.008>

INMET. (2019). INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. Retrieved August 1, 2019, from <http://www.inmet.gov.br/portal/>

Jain, S., Chen, L., Dechet, A., Hertz, A. T., Brus, D. L., Hanley, K., ... Ram, P. K. (2008). An Outbreak of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Associated with Sushi Restaurants in Nevada, 2004. *Clinical Infectious Diseases*, 47(1), 1–7. <https://doi.org/10.1086/588666>

Kang, D.-H., & Fung, D. Y. . (2000). Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 54(1–2), 127–132. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00174-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00174-9)

Kulawik, P., Dordevic, D., Gambuś, F., Szczurowska, K., & Zając, M. (2018). Heavy metal contamination, microbiological spoilage and biogenic amine content in sushi available on the Polish market. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2809–2815. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8778>

Li, X., Kim, M.-J., & Yuk, H.-G. (2018). Influence of 405 nm light-emitting diode illumination on the inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on ready-to-eat fresh salmon surface at chilling storage for 8 h and their

susceptibility to simulated gastric fluid. *Food Control*, 88, 61–68.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2018.01.002>

Lucca, A., & da Silva Torres, E. A. F. (2006). Street-food: The hygiene conditions of hot-dogs sold in São Paulo, Brazil. *Food Control*, 17(4), 312–316.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2004.11.005>

Lyhs, U. (2009). Microbiological Methods. In *Fishery Products* (pp. 318–348). Oxford, UK: Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444322668.ch15>

Manitoba Health. (2013). Food safety guidelines for the preparation of sushi. Manitoba.

Miguéis, S., Santos, C., Saraiva, C., & Esteves, A. (2015). Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants. *Food Control*, 47, 32–36.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2014.06.025>

Muscolino, D., Giarratana, F., Beninati, C., Tornambene, A., Panebianco, A., & Ziino, G. (2014). Hygienic-Sanitary Evaluation of Sushi and Sashimi Sold in Messina and Catania, Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 3(2), 1701.
<https://doi.org/10.4081/ijfs.2014.1701>

Ng, Y.-F., Wong, S.-L., Cheng, H.-L., Yu, P. H.-F., & Chan, S.-W. (2013). The microbiological quality of ready-to-eat food in Siu Mei and Lo Mei shops in Hong Kong. *Food Control*, 34(2), 547–553.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.05.018>

NSW. (2008). Report on food handling practices and microbiological quality of sushi in Australia. Australia. Retrieved from <http://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/Microbiological-quality-of-sushi-in-Australia-survey.pdf>

PHSKC. (2010). Listeriosis at a Sushi Restaurant. Washington.

Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A., & Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of*

Bacteriology, 149(1), 1–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7054139>

Rodrigues, L., dos Santos, R., Mársico, T., Camarinha, C., Mano, B., Junior, C., & Adam, C. (2012). Semina: Ciências Agrárias. *Ciências Agrárias*, 33(5), 1847–1854. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744115019>

SA Health. (2012). Sushi Food Handling Practices. Adelaide. Retrieved from <https://www.sahealth.sa.gov.au/wps/wcm/connect/8f80c500437658709b8cdfc9302c1003/Issue+24B+Sushi+Food+Handling+Business+Guideline.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPACE-8f80c500437658709b8cdfc9302c1003-mJLbgzQ>

Tirloni, E., Bernardi, C., Gandolfi, G., Cattaneo, P., & Stella, S. (2017). 95-100 Retail Sushi in the Warm Season? *Journal of Food and Nutrition Research*, 5(2), 95–100. <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-2-4>

Verbeke, W., Vermeir, I., & Brunsø, K. (2007). Consumer evaluation of fish quality as basis for fish market segmentation. *Food Quality and Preference*, 18(4), 651–661. <https://doi.org/10.1016/J.FOODQUAL.2006.09.005>

Wang, J., Koseki, S., Chung, M.-J., & Oh, D.-H. (2017). A Novel Approach to Predict the Growth of *Staphylococcus aureus* on Rice Cake. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01140>

3 CAPÍTULO 3:

3.1 DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a contaminação microbiana e desenvolver um modelo matemático para prever a multiplicação de *Salmonella* em sushis expostos em diferentes cenários de tempo e temperatura de distribuição. Com base nos resultados, também objetivou-se sugerir parâmetros seguros para a exposição e distribuição de sushis, uma vez que a maioria das legislações brasileiras vigentes permitem expor os mesmos em temperaturas refrigeradas menores ou iguais a 5 °C, o que pode comprometer a sua qualidade sensorial, levando os locais a expor esse produto em temperatura ambiente.

No capítulo 2 foi descrita a investigação dos cenários de tempo e temperatura na distribuição de sushis em diversos restaurantes no município de Porto Alegre, Rio grande do Sul. As visitas nos estabelecimentos só foram possíveis por meio da colaboração entre o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTAUFRGS) com a Equipe de Vigilância em Alimentos (VISA) de Porto Alegre. Essa colaboração possibilitou a entrada nos locais, acompanhar as vistorias oficiais de rotina e permitiu a realização dos experimentos preliminares do presente trabalho nos respectivos estabelecimentos. Dessa forma, foi possível medir a temperatura de distribuição nos *buffets* dos três principais tipos de sushis consumidos. Esses sushis foram previamente identificados por meio de pesquisa na literatura e através do conhecimento prático da equipe de vigilância sanitária. Nas inspeções também foi possível coletar as peças desses sushis, a fim de avaliar a carga microbiana de mesófilos totais e o pH do arroz temperado e demais ingredientes das peças.

Os resultados indicaram que os principais tipos de sushi consumidos foram nigiri, uramaki e hosomaki e que a temperatura deles durante a exposição não variou significativamente entre si, sendo em média 16 °C, durante sua exposição, com ou sem equipamento refrigerado. Esse valor encontrado é

provavelmente devido a variação de funcionalidade dos equipamentos de refrigeração nos *buffets* de cada estabelecimento, como também pela forma de preparo das peças em cada local, antes da exposição das mesmas, uma vez que alguns locais refrigeraram as peças logo após a sua montagem e antes de serem expostas. Outros estabelecimentos preparam as peças e as colocam imediatamente para exposição em *buffet*, o que acarreta numa lenta diminuição na temperatura dos sushis. Alguns locais também não tinham o hábito de ligar os equipamentos refrigerados das pistas antecipadamente, fazendo com que os sushis permanecessem por longos períodos em temperatura ambiente.

Em relação a avaliação dos pHs, o pH do arroz de sushi foi de aproximadamente 4,4 e influenciou na redução do pH dos peixes contidos nas peças. Os valores de pH encontrados no arroz utilizado para preparação dos sushis estavam de acordo com o que propõem as duas portarias municipais para sushis no Brasil (BRASIL, 2016, 2019b), as quais exigem que os locais mantenham o pH do arroz $\leq 4,5$ e que possuam um laudo confirmando tal pH, emitido por laboratório credenciado. Durante as visitas também foi possível perceber que a maioria dos locais cumpriam essa exigência, em razão de que a receita para preparação do arroz para sushi tradicionalmente inclui a adição de molho *Su*, tempero do arroz do sushi composto por vinagre de arroz, açúcar e sal. Esse tempero tem pH próximo a 3,0, o que conseqüentemente acaba reduzindo o pH do arroz e demais ingredientes dos sushis. Essa redução de pH possivelmente contribuiu para um retardo na multiplicação de microrganismos presentes nos sushis, pois em meios ácidos a multiplicação de grande parte das bactérias é inibida.

Já nos resultados de contagem de microrganismos mesófilos totais, foi possível identificar que o sushi uramaki teve as maiores médias de contagens, com diferença significativa entre nigiri e hosomaki. Tais resultados indicaram que o uramaki foi o tipo de sushi com maior contaminação. Provavelmente este resultado se deu devido ao uramaki ser um tipo de sushi preparado em formato de rolo, o que necessita uma maior manipulação na sua preparação, principalmente quando comparado ao nigiri, que é formado apenas com a união

do arroz temperado com o peixe cru. Já a maior contaminação do uramaki em relação ao hosomaki, pode ser explicada por diversos motivos como, em alguns casos, possuir mais ingredientes em sua composição, como por exemplo *cream cheese* (que pode acabar protegendo algum patógeno) e vegetais crus picados; ter o peixe cru sem contato direto com o arroz ácido, o que pode dificultar a diminuição do pH do peixe e conseqüentemente favorecer a multiplicação de algum microrganismo; possuir em sua montagem a peculiaridade do arroz temperado voltado para fora, o qual pode aderir substâncias indesejáveis à preparação, aumentando assim a sua carga microbiana.

Uma vez que os uramaki demonstraram maior contaminação microbiana que os outros tipos de sushi, ele foi escolhido para desenvolver o modelo matemático para prever o comportamento de *Salmonella* em sushis. Inicialmente, foram coletadas peças de uramaki dos locais visitados para desenvolver as curvas de multiplicação do modelo. No entanto, além das contagens totais variarem muito de local para local, nas amostras avaliadas foi observada a presença de colônias pretas típicas de *Salmonella* em meio seletivo (XLD). As colônias foram isoladas e identificadas por espectrometria de massas (MALDI-TOF), confirmando a presença de *Salmonella* em sushis de serviços de alimentação no município de Porto Alegre. Portanto, decidiu-se preparar as peças de uramaki no laboratório, da forma mais asséptica possível, para que a microbiota dos sushis fosse menos variável e que não houvesse células de *Salmonella* diferentes daquelas propositalmente inoculadas.

Para a construção das curvas de crescimento, um *pool* de *Salmonella enterica* (*S. Minnesota*, *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium* L12031, *S. Enteritidis* 55507 e *S. Enteritidis* SE86) foi inoculado em concentrações próximas de 10^3 UFC/g de sushi, a fim de observar possíveis aumentos da população bacteriana em diferentes temperaturas. Os resultados demonstraram que a 7, 15, 20, 25 e 37 °C, a fase *lag* de *Salmonella* foi de aproximadamente 78,0, 14,1, 7,2, 5,9 e 3,4 horas, respectivamente, demonstrando que quanto mais próximo da temperatura ótima de multiplicação de *Salmonella* (37 °C), menor é a fase *lag*, pois a bactéria consegue se multiplicar mais rápido em sua temperatura ideal.

Já em temperaturas mais baixas, o oposto é observado, pois a bactéria precisa de mais tempo para se adaptar em temperaturas que não são ideais (mais baixas). O modelo de Baranyi e Roberts (1994a) foi selecionado como o mais adequado para descrever as curvas de multiplicação de *Salmonella*, gerando valores de R^2 superiores a 0,99 para os modelos primários. Para o modelo secundário, o qual prediz a taxa de multiplicação de *Salmonella* em relação ao intervalo das temperaturas avaliadas, a equação de Ratkowsky (1982) foi utilizada, gerando R^2 de 0,99 e RMSE de 0,02. A utilização do modelo secundário foi importante, uma vez que permitiu a predição dos parâmetros cinéticos da multiplicação de *Salmonella* em qualquer temperatura no intervalo de 7 a 37 °C, mesmo naquelas que não foram testadas experimentalmente. A validação do modelo desenvolvido foi simulada em condições não isotérmicas, utilizando o pior cenário observado nos estabelecimentos visitados. A validação foi realizada a 36,3 °C por 6h, 10 °C por 24h e 29,5 °C por 6h, sequencialmente, cenário este onde houve abusos na temperatura de distribuição, pois alguns locais não faziam o uso de equipamento refrigerado no *buffet* e mantinham os sushis em temperatura ambiente em dias de muito calor na cidade (29-36 °C). Também foi observado, em mais de um estabelecimento, o reaproveitamento de peças de sushi já expostas, o que justificou a avaliação do período de 24 horas. O armazenamento refrigerado das peças prontas em temperaturas superiores a 5 °C (~10°C) também foi observado nas visitas, justificando a avaliação dessa temperatura. No final do período de validação, a concentração de *Salmonella* atingiu 6,7 log UFC/g, gerando valores de Bias (0,97) e Acuracia (1,03) adequados, mostrando que nas condições reais (não isotérmicas) observadas nas visitas, um sushi pronto para ser consumido poderia conter quase 7 log UFC/g de *Salmonella*.

Com a utilização do cálculo de tempo de multiplicação insignificante (ζ) e dos parâmetros cinéticos obtidos pelo modelo desenvolvido, foi possível calcular o tempo e a temperatura máxima em que não houvesse multiplicação de *Salmonella* em sushis. Considerando que a média das temperaturas de distribuição mais altas das peças de uramaki foi de aproximadamente 18 °C, o

tempo de crescimento insignificante (ζ) para *Salmonella*, nessa temperatura, foi de 8,9 horas. Se os sushis forem distribuídos a 20 °C o ζ seria 7,3 horas, a 23,7 °C seria 6 horas, a 25 °C seria 4,8 horas e a 37 °C seria 3,3 horas. Por outro lado, diminuindo a temperatura de distribuição, o ζ aumentou expressivamente, ou seja, a 7 °C ele correspondeu a 83 horas, e a 15 °C foi de 12,8 horas. Esse último valor é duas vezes maior que o tempo máximo permitido para um alimento preparado ser distribuído em um *buffet* (6h).

No entanto, a fase *lag* das contagens de microrganismos mesófilos totais no uramaki, exposto a 15 °C, predita pelo Programa *Combase*, foi de $10,9 \pm 7,7$ horas. Embora a média de tempo seja bastante superior ao tempo máximo (6 horas) permitido para distribuição de alimentos em um *buffet*, o desvio padrão foi elevado (7,7 horas), o que pode ser justificado pela multiplicação mais rápida de alguns microrganismos, provavelmente, psicrófilos e/ou psicrotróficos. Ainda assim, os resultados das contagens da curva de multiplicação de mesófilos totais, a 15 °C, preditos pelo *Combase*, demonstraram que, no tempo zero, o número de log UFC/g foi de 3,1, aumentando para 3,8 log UFC/g, após 8,5 horas. Esses números demonstraram que o aumento da população de mesófilos totais em sushi exposto a 15 °C não foi expressivo, mesmo após um tempo de exposição maior que 6 horas. Esses resultados, assim como os resultados do modelo de *Salmonella*, sugerem que um binômio de temperatura e tempo seguros para a distribuição de sushi seriam de 15 °C por até 6 horas. Cabe ressaltar que mesmo utilizando esses parâmetros, os sushis só serão seguros se forem produzidos com Boas Práticas, a fim de evitar a sua contaminação por patógenos alimentares, principalmente aqueles com doses infectantes baixas.

3.2 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que não houve diferença significativa nas temperaturas de distribuição de nigiri, uramaki e hosomaki.

O pH ácido do arroz temperado reduziu o pH do peixe utilizado nos sushis, indicando que ele pode influenciar a multiplicação microbiana nos sushis. No entanto, o arroz temperado ($\text{pH} \leq 4,5$) não impediu a completa multiplicação de *Salmonella* e da microbiota acompanhante (contagem de microrganismos mesófilos totais) dos sushis expostos a temperaturas entre 7 e 37 °C.

Entre os sushis analisados nos estabelecimentos, o uramaki foi o que apresentou a maior média de contagem de microrganismos mesófilos totais, sendo identificado como o mais contaminado.

O modelo desenvolvido foi validado e considerado adequado para avaliar a multiplicação de *Salmonella* em sushis expostos entre 7 e 37 °C. O parâmetro de multiplicação insignificante (ζ) identificou binômios de tempo e temperatura para vários cenários de distribuição em *buffet* de sushis, demonstrando ser adequado para ser utilizado na predição da multiplicação de *Salmonella* em diversos cenários de tempo e temperatura.

Com base nos resultados, sugere-se que temperaturas ≤ 15 °C por até 6 horas seriam parâmetros seguros para a distribuição de sushis preparados com Boas Práticas.

Dessa forma, os resultados obtidos nesse estudo podem ser utilizados pela Vigilância Sanitária na definição de estratégias para conscientização dos consumidores, dos manipuladores de alimentos e dos agentes de fiscalização, fornecendo bases científicas para implementação de normas e de legislações. Essas ações podem impactar grandemente a saúde pública, já que a implementação de programas e de ações cientificamente embasadas podem contribuir para a redução dos surtos de salmonelose ligados ao consumo de sushis no Brasil e no mundo.

4 REFERÊNCIAS

ABRASEL. **Pesquisa aponta os principais dados sobre o uso de tecnologias no setor de alimentação fora do lar - Abrasel.** 2019. Disponível em: <<https://abrase.com.br/noticias/noticias/pesquisa-aponta-os-principais-dados-sobre-o-uso-de-tecnologias-no-setor-de-alimentacao-fora-do-lar/>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

ARMANI, A. et al. Is raw better? A multiple DNA barcoding approach (full and mini) based on mitochondrial and nuclear markers reveals low rates of misdescription in sushi products sold on the Italian market. **Food Control**, [s. l.], v. 79, p. 126–133, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713517301548#bib42>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

BARANYI, J. et al. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 61–75, 1995. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016816059400154X>>. Acesso em: 22 ago. 2019.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 3–4, p. 277–294, 1994. a. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160594901570>>. Acesso em: 22 jun. 2019.

BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 23, n. 3–4, p. 277–294, 1994. b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168160594901570>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

BARRALET, J. et al. Outbreak of *Salmonella* Singapore associated with eating sushi. **Communicable diseases intelligence**, [s. l.], v. 28, p. 527–528, 2014.

Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/7989507_Outbreak_of_Salmonella_Singapore_associated_with_eating_sushi>. Acesso em: 25 jun. 2019.

BESSER, J. M. *Salmonella* epidemiology: A whirlwind of change. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 71, p. 55–59, 2018.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Brasil, 2001. p. 37.

BRASIL. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Brasil, 2004. p. 14.

BRASIL. **Bactéria em sushi de supermercado no Cariri causou infecção, diz laudo.** 2012. Disponível em:

<<http://g1.globo.com/ceara/noticia/2012/05/bacteria-em-sushi-de-supermercado-no-cariri-causou-infeccao-diz-laudo.html>>. Acesso em: 14 ago. 2019.

BRASIL. Portaria nº 1109, de 23 agosto de 2016. Brasil, 2016. p. 4.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Brasil, 2017. p. 1–77.

BRASIL. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde.** [s.l: s.n.].

BRASIL. Portaria 1405, de 05 dezembro de 2019. **Diário Oficial do Município**, 2019b. p. 1–17.

BURGER, J. et al. Sushi consumption rates and mercury levels in sushi: ethnic and demographic differences in exposure. **Journal of Risk Research**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 981–997, 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13669877.2013.822925>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

CDC. **Multistate Outbreak of *Salmonella* Bareilly and *Salmonella* Nchanga Infections Associated with a Raw Scraped Ground Tuna Product (Final Update)**. 2012. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/bareilly-04-12/index.html>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

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

CDC. **Salmonella Homepage | CDC**. 2019a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

CDC. **Sushi Safety**. British Columbia. Disponível em: <[http://www.bccdc.ca/resource-gallery/Documents/Educational Materials/EH/FPS/Fish/SushiSafety.pdf](http://www.bccdc.ca/resource-gallery/Documents/Educational%20Materials/EH/FPS/Fish/SushiSafety.pdf)>.

CFS. **Microbiological Guidelines for Ready-to-eat Food**. Hong Kong. Disponível em: <http://www.cfs.gov.hk/english/whatsnew/whatsnew_act/files/MBGL RTE food_e.pdf>.

CFS. **Sushi and Sashimi in Hong Kong**. Hong Kong. Disponível em: <https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_rafs/programme_rafs_fm_01_09_sshk.html>. Acesso em: 19 jul. 2019.

CGVS. **Segurança dos alimentos sob a perspectiva da Porto Alegre**. Porto Alegre, 2012.

DE SILVA, D.; YAMAO, M. A yen for sushi: an analysis of demographic and behavioural patterns of sushi consumption in Japan. **Journal of Foodservice**, [s. l.], v. 17, p. 63–76, 2006. Disponível em: <<http://ai.libproxy.edmc.edu/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fsr&AN=21523386&scope=site>>

DOH. **ARTICLE 81 FOOD PREPARATION AND FOOD ESTABLISHMENTS**SUSA, 2015.

EFSA. **Salmonella** the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union. 2019. Disponível em:

<<https://www.efsa.europa.eu/en/news/salmonella-most-common-cause-foodborne-outbreaks-european-union>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

ELIAS, S. D. O. Modelagem dos Parâmetros Cinéticos de Multiplicação de *Salmonella* Enteritidis SE86 em Maionese Caseira e Práticas de Preparo, Estocagem e Consumo desse Alimento no RS. [s. l.], p. 104, 2014.

ELIAS, S.; NORONHA, T. B.; TONDO, E. C. Assessment of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 growth on lettuce exposed to isothermal and non-isothermal conditions. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 72, p. 206–213, 2018.

Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017308274>>.

Acesso em: 2 jun. 2019.

FUSCO, V. et al. Food safety aspects on ethnic foods: toxicological and microbial risks. **Current Opinion in Food Science**, [s. l.], v. 6, p. 24–32, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799315001393>>.

Acesso em: 2 jun. 2019.

GEERAERD, A. H.; HERREMANS, C. H.; VAN IMPE, J. F. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 185–209, 2000.

GIRARD, S.; MARIOJOULS, C. **What is the demand for farmed fish on the European markets?**, 2008. Disponível em:

<https://ir.library.oregonstate.edu/concern/conference_proceedings_or_journals/9c67wn70r>. Acesso em: 25 jun. 2019.

GOMES ALFAMA, E. R. et al. Assessment of temperature distribution of cold and hot meals in food services and the prediction growth of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, [s. l.], v. 106, p. 106725, 2019.

Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713519303068>>.

Acesso em: 14 jul. 2019.

GUMUDAVELLI, V. et al. Dynamic predictive model for growth of *Salmonella* enteritidis in egg yolk. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 72, n. 7, 2007.

HABERBECK, L. U. et al. **MODELAGEM DA INATIVAÇÃO ISOTÉRMICA E NÃO ISOTÉRMICA DE *Bacillus coagulans* POR TRATAMENTO TERMOQUÍMICO UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO**. [s.l: s.n.]. 2011.

HEINITZ, M. L. et al. Incidence of *Salmonella* in Fish and Seafood. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 579–592, 2000. Disponível em: <<http://jfoodprotection.org/doi/10.4315/0362-028X-63.5.579>>. Acesso em: 6 jul. 2019.

HOEL, S. et al. Assessment of Microbiological Quality of Retail Fresh Sushi from Selected Sources in Norway. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 78, n. 5, p. 977–982, 2015. Disponível em: <<http://jfoodprotection.org/doi/10.4315/0362-028X.JFP-14-480>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

HOEL, S.; VADSTEIN, O.; JAKOBSEN, A. N. Growth of mesophilic *Aeromonas salmonicida* in an experimental model of nigiri sushi during cold storage. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 285, p. 1–6, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160518303519>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

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

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

INMET. **INMET - Instituto Nacional de Meteorologia**. 2019. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 1 ago. 2019.

JAIN, S. et al. An Outbreak of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Associated with Sushi Restaurants in Nevada, 2004. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 1–7, 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/588666>>. Acesso em: 19 jul. 2019.

JAY, J. **Microbiologia de Alimentos**. 6º ed. Porto Alegre.

KANG, D.-H.; FUNG, D. Y. . Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 1–2, p. 127–132, 2000. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160599001749>>. Acesso em: 14 jul. 2019.

KULAWIK, P. et al. Heavy metal contamination, microbiological spoilage and biogenic amine content in sushi available on the Polish market. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 98, n. 7, p. 2809–2815, 2018.

LI, X.; KIM, M.-J.; YUK, H.-G. Influence of 405 nm light-emitting diode illumination on the inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on ready-to-eat fresh salmon surface at chilling storage for 8 h and their susceptibility to simulated gastric fluid. **Food Control**, [s. l.], v. 88, p. 61–68, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713518300021>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

LIANG, W.-L. et al. The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong. **Food Control**, [s. l.], v. 69, p. 45–50, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713516301840>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

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

LUCCA, A.; DA SILVA TORRES, E. A. F. Street-food: The hygiene conditions of hot-dogs sold in São Paulo, Brazil. **Food Control**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 312–316, 2006. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713504002671>>.

Acesso em: 25 jun. 2019.

LYHS, U. Microbiological Methods. In: **Fishery Products**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009. p. 318–348.

MAKER, T. S. **The Most Popular Sushi Rolls**. 2019. Disponível em: <<https://topsushimaker.com/most-popular-sushi-rolls/>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

MALHEIROS, P. D. S.; DE PAULA, C. M. D.; TONDO, E. C. Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: Uma comparação com linhagens de outros sorovares. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 751–755, 2007.

MANITOBA HEALTH. **Food safety guidelines for the preparation of sushi**. Manitoba.

MCMEEKIN, T. et al. The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 2–9, 2008.

MIGUÉIS, S. et al. Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants. **Food Control**, [s. l.], v. 47, p. 32–36, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514003545>>.

Acesso em: 2 jun. 2019.

MUSCOLINO, D. et al. Hygienic-Sanitary Evaluation of Sushi and Sashimi Sold in Messina and Catania, Italy. **Italian journal of food safety**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 1701, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27800343>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases - The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 139, n. SUPPL. 1, 2010.

NG, Y.-F. et al. The microbiological quality of ready-to-eat food in Siu Mei and Lo Mei shops in Hong Kong. **Food Control**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 547–553, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513002594>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

NSW. **Report on food handling practices and microbiological quality of sushi in Australia.** Australia. Disponível em: <<http://www.foodstandards.gov.au/publications/documents/Microbiological-quality-of-sushi-in-Australia-survey.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

PHSKC. **Listeriosis at a Sushi Restaurant.** Washington. 2010.

QUESTED, T. E. et al. Trends in technology, trade and consumption likely to impact on microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 139, n. SUPPL. 1, 2010.

RATKOWSKY, D. A. et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. **Journal of bacteriology**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 1–5, 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7054139>>. Acesso em: 1 ago. 2019.

RODRIGUES, L. et al. Semina: Ciências Agrárias. **Ciências Agrárias**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1847–1854, 2012. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744115019>>. Acesso em: 9 maio. 2018.

ROSS, T.; MCMEEKIN, T. A. Modeling microbial growth within food safety risk assessments. **Risk Analysis**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 179–197, 2003.

SA HEALTH. **Sushi Food Handling Practices.** Adelaide. Disponível em:

<<https://www.sahealth.sa.gov.au/wps/wcm/connect/8f80c500437658709b8cdfc9302c1003/Issue+24B+Sushi+Food+Handling+Business+Guideline.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=ROOTWORKSPACE-8f80c500437658709b8cdfc9302c1003-mJLbgzQ>>. Acesso em: 8 jul. 2019.

SANCHES, M.; SALAY, E. Alimentação fora do domicílio de consumidores do município de Campinas, São Paulo. **Revista de Nutricao**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 295–304, 2011.

SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D. W. Modeling the growth rate and lag time of different strains of *Salmonella* enterica and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 267–273, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002011002711>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

SEBRAE. **Self-service lidera negócios de alimentação fora do lar**. 2017. Disponível em: <<http://www.agenciasebrae.com.br/sites/asn/uf/NA/self-service-lidera-negocios-de-alimentacao-fora-do-lar,24cfcf74de20f510VgnVCM1000004c00210aRCRD>>. Acesso em: 30 dez. 2019.

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

SILVA, L. P. A.; DA SILVA, R. C. S. P.; DA CRUZ, R. J.; DA SILVA, T. R.; SANTOS, V. T. Benefícios da Utilização do Software de Gestão de Estoque no Setor de Alimentação Fora do Lar. [s. l.], 2019.

TAUXE, R. V. et al. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 139, n. SUPPL. 1, 2010.

TIRLONI, E. et al. 95-100 Retail Sushi in the Warm Season? **Journal of Food and Nutrition Research**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 95–100, 2017. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/jfnr/5/2/4>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. 2ª edição ed. Porto Alegre, 2019.

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

VERBEKE, W.; VERMEIR, I.; BRUNSØ, K. Consumer evaluation of fish quality as basis for fish market segmentation. **Food Quality and Preference**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 651–661, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0950329306001364>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

WANG, H.-Y. et al. Leuconostoc Mesenteroides Growth in Food Products: Prediction and Sensitivity Analysis by Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference Systems. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. e64995, 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0064995>>. Acesso em: 21 jun. 2019.

WANG, J. et al. A Novel Approach to Predict the Growth of Staphylococcus aureus on Rice Cake. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 8, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01140/full>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

WEI, C. **An Illustrated History of Sushi | First We Feast**. 2015. Disponível em: <<https://firstwefeast.com/eat/2015/02/illustrated-history-of-sushi>>. Acesso em: 7 jan. 2020.

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

WHO. **Five Keys to Safer Food Manual**. 2016. [s.l: s.n.].

ZANDONADI, R. P. et al. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto-serviço. **Revista de Nutricao**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 19–26, 2007.