

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOÃO PEDRO SEQUEIRA PESSOA

**AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *Salmonella* spp. EM CARNE DE FRANGO  
EXPOSTA A CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS**

PORTO ALEGRE

2019

JOÃO PEDRO SEQUEIRA PESSOA

**AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *Salmonella* spp. EM CARNE DE FRANGO  
EXPOSTA A CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS**

Trabalho de Conclusão do curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Coorientadora: Ma. Cláudia Titze Hessel

PORTO ALEGRE

2019

ESPAÇO RESARVADO: SABI / UFRGS

JOÃO PEDRO SEQUEIRA PESSOA

**AVALIAÇÃO DA MULTIPLICAÇÃO DE *Salmonella* spp. EM CARNE DE FRANGO  
EXPOSTA A CONDIÇÕES ISOTÉRMICAS E NÃO ISOTÉRMICAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Aprovado em: 16 / 12 / 2019

---

Eduardo Cesar Tondo (Orientador)

Doutor em Ciências Biológicas

ICTA/UFRGS

---

Cláudia Titze Hessel (Coorientadora)

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

ICTA/UFRGS

---

Katia Rezzadori

Doutora em Engenharia de Alimentos

ICTA/UFRGS

---

Danielle Carmo

Engenheira de Alimentos

ICTA/UFRGS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento é para minha família que sempre me apoiou, confiando em minhas escolhas e permitindo que eu me desenvolvesse com base na ética e honestidade. Em especial a minha mãe e avó, que garantiram o melhor ambiente familiar possível, sempre apoiando a educação, garantindo que eu tivesse o privilégio de me preocupar unicamente com os estudos. Não há dúvidas que sem vocês nada seria possível.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo, por ter me recebido e orientado no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos desde o meu primeiro contato com a pesquisa acadêmica. Sendo sempre, não só um exemplo de conhecimento técnico, mas de dedicação e competência profissional, exercendo papel fundamental na reafirmação da minha escolha de tornar-me um profissional de Engenharia de Alimentos.

A todos colegas de trabalho que tive no Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, por compartilharem conhecimento, permitindo que eu participasse dos mais diversos projetos de pesquisa. Em especial à Vera Masuti por todo suporte e conselhos e à Susana Elias quem sempre tive como referência técnica, prestando grande apoio também ao longo deste trabalho. À Cláudia Titze Hessel por todos ensinamentos e parceria no período de iniciação científica. Especialmente nessa última etapa, por ter aceito ser minha coorientadora, trabalhando sempre com muita paciência, disposição e habilidade em tornar as dificuldades ao longo dos experimentos mais simples de serem enfrentadas.

Aos colegas e amigos que fiz durante minha trajetória acadêmica.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos cujas portas sempre estiveram abertas para seus alunos, construindo um ambiente agradável e acessível, de parceria entre alunos e professores.

Aos membros da banca, por aceitarem avaliar este trabalho, dispondo de seu tempo e contribuindo com muita sabedoria.

## RESUMO

A produção avícola representa grande impacto na economia brasileira, já que o país lidera atualmente a exportação de carne de frango. A qualidade e segurança do produto a nível do consumidor depende de esforços em diferentes setores, envolvendo toda a cadeia de produção e fazendo uso de ferramentas robustas de gestão de segurança de alimentos. A microbiologia preditiva permite descrever o comportamento de microrganismos em matrizes específicas de alimentos expostas a condições diferentes, como: temperatura, pH, pressão, entre outros. Nesse estudo, amostras de carne crua de frango e pele foram contaminadas artificialmente com um *pool* de *Salmonella* spp. com objetivo de avaliar a multiplicação microbiana em diferentes temperaturas. O *pool* era composto por cinco sorovares que representam os sorovares de maior importância para indústria avícola brasileira. Modelos Primários e Secundários foram desenvolvidos através do armazenamento sob condições isotérmicas. Os resultados não mostraram multiplicação a 5°C. A 7, 15, 25, 37 e 45°C as fases *lag* foram  $103,86 \pm 15,59$ h,  $6,95 \pm 2,27$ h,  $1,99 \pm 0,47$ h,  $0,55 \pm 0,43$ h e  $0,96 \pm 0,39$ h, respectivamente. A população final e o tempo para obter a máxima concentração de *Salmonella* foram  $4,90 \pm 0,08$  UFC/g em 317 h (7°C);  $7,5 \pm 0,08$  UFC/g em 72 h (15°C);  $9,19 \pm 0,07$  UFC/g em 31 h (25°C);  $8,52 \pm 0,10$  UFC/g em 15 h (37°C);  $7,63 \pm 0,11$  UFC/g em 12 h (45°C). O modelo secundário foi adequado para descrever a multiplicação de *Salmonella* em qualquer temperatura entre 7 e 45°C, apresentando bom ajuste com coeficiente de determinação e erro médio da raiz quadrada de 0,97 e 0,029, respectivamente. A modelagem dinâmica da multiplicação de *Salmonella* foi validada através de experimento em condições não-isotérmicas através da simulação de um cenário de abuso de temperatura, apresentando uma boa performance (RMSE de 0,18, Viés de 1,11 e Acurácia de 1,26). Deste modo, o modelo desenvolvido neste estudo foi adequado para prever a multiplicação de *Salmonella* em combinação de carne e pele de peito de frango cru.

Palavras-chave: carne de frango crua, patógenos alimentares, microbiologia preditiva, modelos de crescimento.

## ABSTRACT

Chicken production represents great impact in Brazilian economy, as the country leads world exports. Product quality and safety at consumer level depends on efforts among different sectors involving the entire production chain and using robust food safety management tools. Predictive microbiology allows to describe microorganism's behavior in a specific food matrix exposed to different conditions, as temperature, pH, pressure, among others. In this study, raw chicken breast meat-skin samples were artificially contaminated with *Salmonella* spp. pool in order to evaluate bacteriological growth at different temperatures. The pool consisted of five *Salmonella* serovars which represent the most important serovars for Brazilian chicken industry. Primary and Secondary models were developed through storage under isothermal conditions. Results showed no growth at 5°C. At 7, 15, 25, 37 and 45°C lag times were 103.86±15.59h, 6.95±2.27h, 1.99±0.47h, 0.55±0.43h e 0.96±0.39h, respectively. Final population and time to reach maximum *Salmonella* concentration were 4.90±0.08 CFU/g in 317 h (7°C); 7.5±0.08 CFU/g in 72 h (15°C); 9.19±0.07 CFU/g in 31 h (25°C); 8.52±0.10CFU/g in 15 h (37°C); 7.63±0.11CFU/g in 12 h (45°C). Secondary model was suitable to describe *Salmonella* growth in any temperature between 7 and 45°C, well-adjusted with determination coefficient and root mean square error of 0.97 and 0.029, respectively. Dynamic modeling of *Salmonella* growth was validated through non-isothermal conditions in an extreme time-temperature abuse scenario, displaying an overall good performance (RMSE of 0.18, Bias of 1.11 and Accuracy of 1.26). Hence, the developed model for *Salmonella* spp. is suitable to predict growth in raw chicken breast meat-skin combination exposed to temperatures ranging from 7 to 45 °C.

Keywords: raw chicken, foodborne pathogens, predictive microbiology, growth models.



**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Curvas de multiplicação microbiana em função do tempo .....20

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Principais patógenos encontrados em carne de frango .....	15
--	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos .....	12
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
3.1. Carne de frango.....	13
3.1.1. Panorama de produção .....	13
3.1.2. Microbiologia da carne de frango.....	14
3.1.3. Segurança dos alimentos na cadeia produtiva de carne de frango.....	16
3.2. <i>Salmonella</i> spp. ....	17
3.2.1. Sorovares .....	18
3.3. Microbiologia Preditiva.....	19
3.3.1. Modelos primários .....	20
3.3.2. Modelos secundários.....	21
3.3.3. Modelos terciários .....	22
<b>4. ARTIGO.....</b>	<b>25</b>
<b>5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>40</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil exerce papel de destaque no mercado mundial de carnes, sendo atualmente o maior exportador e terceiro maior produtor de carne de frango. O setor está em crescimento e representa uma oportunidade para o desenvolvimento da indústria nacional. A fim de atender aos diferentes mercados, o país se atualiza constantemente, implementando novos métodos de gestão e controle ao longo da cadeia produtiva. Para tanto, é necessário alinhar a alta produtividade no campo com a obtenção de um produto seguro e de qualidade, na indústria e, em seguida, em nível do consumidor final.

A carne de frango possui uma matriz nutricional complexa, o que permite o desenvolvimento de uma ampla gama de microrganismos. Dentre eles se destaca a *Salmonella* spp., patógeno de origem alimentar responsável por grande parte dos surtos notificados no mundo. Apesar de todos cuidados das empresas, seu controle é difícil, pois a bactéria pode estar presente nos intestinos e ovários das aves de forma assintomática, podendo ser transmitida também para os ovos e carne. A *Salmonella* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae, é flagelada, anaeróbia facultativa e não formadora de esporos. Também é mesófila, com condições para multiplicação entre 5 e 46°C, pH 4 e 6 e atividade de água entre 0,94 e 0,99. A principal doença associada é a salmonelose humana não tifoide, caracterizada principalmente por dores abdominais, febre, diarreia e vômito. A dose infectante pode variar de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/g, sendo que muitos surtos já foram registrados devido a doses mais baixas. Existem mais de 2600 sorovares de *Salmonella*, e a prevalência destes varia ao redor do mundo, sendo *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* os mais comumente identificados em surtos de salmonelose humana.

Tendo em vista a posição estratégica do Brasil no mercado mundial de carne de frango, frente susceptibilidade de contaminação do alimento por *Salmonella*, torna-se necessário empregar ferramentas sofisticadas na gestão da Segurança de Alimentos para o controle de *Salmonella* nas indústrias de alimentos. Dentre elas se destaca a Microbiologia Preditiva, recurso que permite descrever matematicamente o comportamento de microrganismos em determinadas matrizes alimentícias, expostas a um amplo espectro de temperaturas, pH, entre outros fatores, por períodos variados.

Esta ferramenta possibilita conhecer melhor o comportamento de microrganismos em meio a cenários reais, garantindo uma tomada de decisões mais assertiva no controle dos riscos microbiológicos. Uma vez desenvolvidos e disponibilizados, as aplicações dos modelos de microbiologia preditiva são as mais diversas. Podendo ser empregado desde a validação de tempo-temperatura em processos, a fim de atender a legislação, até mesmo em estudos complexos, como a Avaliação de Risco.

Os estudos existentes de microbiologia preditiva de *Salmonella* em carne de frango têm avaliado a influência de somente um sorovar deste patógeno, ou ainda, estudam a multiplicação de *Salmonella* em carne de frango tendo a sua microbiota reduzida. A fim de fornecer uma ferramenta possível de ser utilizada nas indústrias nacionais, é necessário compreender o comportamento dos sorovares de *Salmonella* com maior importância para a avicultura brasileira e considerar a influência da microbiota acompanhante da carne de frango sobre o desenvolvimento destes sorovares. Assim, este trabalho teve por objetivo construir modelos matemáticos de multiplicação de *Salmonella* spp. em carne de frango exposta a condições isotérmicas e não-isotérmicas, considerando os cenários de tempo, temperatura e alguns dos principais sorovares encontrados na cadeia de frango do Brasil.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Construir modelos de multiplicação de *Salmonella* spp. em carne de frango exposta a condições isotérmicas e validar através de experimento em condições não-isotérmicas, considerando os cenários de tempo, temperatura e sorovares de importância para a produção de frangos do Brasil.

### 2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Construir curvas de multiplicação para *Salmonella* spp. em carne de frango, contaminada artificialmente com sorovares de interesse, exposta a temperaturas de 7°C, 15°C, 25°C, 37°C e 45°C;
- ✓ Construir modelos primários de microbiologia preditiva a fim de determinar parâmetros cinéticos de multiplicação (tempo de fase *lag*, taxa de multiplicação e população máxima);
- ✓ Construir um modelo secundário de microbiologia preditiva, permitindo descrever o comportamento de *Salmonella* spp. em temperaturas não avaliadas experimentalmente, dentro dos limites testados (7°C a 45°C);
- ✓ Validar os modelos através de experimento conduzido em condições não-isotérmicas, avaliando a adequação dos mesmos;
- ✓ Comparar os modelos obtidos com modelos gerados pelo *software ComBase Predictive Model*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Carne de frango

A carne de frango é uma fonte de proteína animal de grande importância ao redor do mundo. Sua produção apresenta alta eficiência de aproveitamento de insumos e baixo impacto ambiental, em comparação à de outros animais de corte (WIEDEMANN; MCGAHAN; MURPHY, 2017). Alexandratos e Bruinsma (2012) apontam que, entre 2005 e 2050, a carne de frango deverá exibir um crescimento de demanda duas vezes maior do que produtos como carne de gado e ovos. Para se adaptar às novas exigências do mercado, o setor produtivo se atualiza continuamente, buscando aliar alto rendimento com qualidade nutricional, sensorial e sanitária.

##### 3.1.1. Panorama de produção

Dentro de um cenário de produção global de cerca de 90 milhões de toneladas anuais de carne de frango, o Brasil ocupa posição de destaque, sendo o maior exportador de carne de frango no mundo (4 050 000 t) e o terceiro maior produtor (13 931 000 t, atrás da China e dos Estados Unidos) (FAO/WHO, 2019). O consumo *per capita* do brasileiro é de 42,07 kg ao ano por habitante, particularmente alto quando comparado ao de países como China (8 kg/hab.ano) e Índia (3 kg/hab.ano), o que revela um grande potencial de aumento do consumo global, e consequentemente das exportações, nos próximos anos (TALAMINI, MARTINS; FILHO, 2018).

Fatores como a diversificação geográfica de países parceiros e o status de uma produção livre de Influenza A contribuem para a consolidação do Brasil no mercado internacional de carne de frango (FAO/WHO, 2019). A exportação se dá principalmente na forma de cortes (63%) e frangos inteiros (29%), para mais de 130 países, sendo os principais Arábia Saudita (392 000 t), China (364 000 t), Japão (328 000 t) e África do Sul (287 000 t), (TALAMINI; MARTINS; FILHO, 2018). A constante adaptação das indústrias aos padrões internacionais se torna, portanto, imprescindível à manutenção da competitividade no setor.

### 3.1.2. Microbiologia da carne de frango

A carne de frango é uma matriz complexa que pode suportar o crescimento de diversos microrganismos (Wheeler et al., 2014), podendo constituir uma fonte importante de enfermidades ao consumidor quando sua produção não é adequadamente controlada. A alta incidência de surtos relacionados a carnes e derivados no Brasil (15% do total de surtos onde o alimento causador foi identificado) evidencia a necessidade de controlar os fatores que afetam a contaminação e proliferação de microrganismos nessa categoria de produtos (BRASIL, 2019).

Fatores intrínsecos que favorecem o desenvolvimento de uma ampla gama de microrganismos na carne de frango incluem: alto conteúdo proteico; elevada atividade de água (0,98-0,99); pH próximo da neutralidade (5.6-6.4) e alta capacidade tamponante (FORSYTHE, 2013; MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012).

O frango pode carregar inúmeras bactérias em sua pele (*Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.). Além disso, os intestinos e ovários das aves podem ser colonizados assintomaticamente por *Salmonella* spp., podendo transmiti-lá também para os ovos (ANTUNES et al., 2016; DUNKLEY et al., 2009). As cepas de *Staphylococcus aureus* normalmente encontradas em frangos geralmente não são patogênicas; as enfermidades vinculadas a esse microrganismo estão geralmente associadas à manipulação do produto (FORSYTHE, 2013).

Os patógenos como *Salmonella* que são principalmente eliminados pelas fezes das aves e não requerem necessariamente multiplicação no alimento para causar enfermidades, são mais efetivamente controlados durante os estágios da criação e abate (por exemplo, *Salmonella* spp.); por outro lado, os patógenos que requerem crescimento/produção de toxinas para oferecerem risco (*Clostridium perfringens*), ou cuja principal fonte de contaminação é o manuseio (*S. aureus*) são mais efetivamente controlados no processamento/preparação de alimentos/varejo (BUNCIC; ANTIC; BLAGOJEVIC, 2017).

No Quadro 1, são apresentados os principais patógenos encontrados em carne de frango. Segundo a probabilidade de ocorrência no alimento, o número de enfermidades registradas e sua severidade, destacam-se os gêneros *Salmonella* e *Campylobacter* como patógenos prioritários para os quais é necessário o estabelecimento de medidas de controle (BUNCIC; ANTIC; BLAGOJEVIC, 2017).



De acordo com EFSA e ECDC (2018), carne e derivados somaram 16,8% dos casos registrados de salmonelose veiculada por alimentos na Europa em 2017, atrás apenas de ovos e derivados (36,8%). No Brasil, a carne e seus derivados respondem por 16,4% dos casos de salmonelose (além dos surtos associados a múltiplos alimentos ou alimentos mistos, que podem incluir carne) registrados entre 2014 e 2017 (BRASIL, 2017a).

Quadro 1. Principais patógenos encontrados em carne de frango.

Patógenos	Enfermidade	Etapas críticas de controle	Prioridade
<i>Salmonella</i> spp. não-tifoide	Infecção	Criadouro, abatedouro	Alta
<i>Campylobacter</i> spp. termofílico	Infecção	Criadouro, abatedouro	Alta
<i>Clostridium perfringens</i>	Toxinfecção	Manuseio no varejo/serviços de alimentação/domicílio	Média
<i>Clostridium botulinum</i>	Intoxicação	Manuseio no varejo/serviços de alimentação/domicílio	Baixa a média
<i>Bacillus cereus</i>	Intoxicação, toxinfecção	Manuseio no varejo/serviços de alimentação/domicílio	Baixa a média
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicação	Manuseio no varejo/serviços de alimentação/domicílio	Baixa a média
<i>Listeria monocytogenes</i>	Infecção	Manuseio no varejo/serviços de alimentação/domicílio	Baixa a média
<i>Escherichia coli</i> verocitotoxigênica	Toxinfecção	Criadouro, abatedouro	Baixa
<i>Clostridium difficile</i>	Infecção, toxinfecção	Diversas	Baixa
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Infecção	Diversas	Baixa

Fonte: adaptado de BHUNIA, 2018; BUNCIC, 2014; BUNCIC; ANTIC; BLAGOJEVIC, 2017; COX et al., 2005; EFSA, 2012; FSANZ, 2005; NINIOS et al., 2014.

A RDC 12/2001 da ANVISA estabelece os parâmetros microbiológicos para a carne de frango e seus derivados no Brasil. Para carnes cruas ou *in natura*, resfriadas ou congeladas, temperadas ou não (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes), é exigida a quantificação de coliformes a 45°C/g, cujo valor não deve superar 10<sup>4</sup> UFC/g; para miúdos de aves, o valor máximo permitido é 10<sup>5</sup> UFC/g. Para carnes embaladas

a vácuo, são obrigatórios ainda testes para estafilococos coagulase positiva (máx.  $3 \times 10^3$  UFC/g) e *Salmonella* (deve estar ausente em 25 g). Em produtos cárneos, os parâmetros variam, sendo ainda necessário para alguns casos avaliar *Clostridium* sulfito redutor a 46°C (máx.  $5 \times 10^2$  UFC/g) (BRASIL, 2001). Destaca-se a exigência rígida de ausência em 25 g para *Salmonella* spp., que se aplica a todos os derivados da carne de frango devido ao alto risco que oferece ao consumidor.

Para garantir o cumprimento das normas sanitárias e a manutenção da qualidade, cabe às indústrias investir em controles efetivos ao longo de toda a cadeia produtiva (DE CESARE, 2018).

### 3.1.3. Segurança dos alimentos na cadeia produtiva de carne de frango

A indústria de carne de frango conta com uma elevada gama de produtos, *in natura* e processados, incluindo frango inteiro e cortes congelados ou resfriados, além de produtos industrializados como empanados, marinados, temperados e cozidos. Medidas de controle microbiológico adaptadas a cada linha de processamento e seus perigos pertinentes se fazem necessárias.

Ações de controle na cadeia primária incluem: abate de lotes separadamente, com objetivo de minimizar a contaminação cruzada nos abatedouros; detecção preliminar de aves contaminadas com *Salmonella* spp.; transporte em condições que minimizem o stress e a contaminação entre animais (FAO/WHO, 2002); desinfecção dos recipientes de transporte (EFSA, 2011); inspeção visual dos animais vivos muito contaminados com fezes; controle de tempos e temperaturas (BUNCIC; ANTIC; BLAGOJEVIC, 2017).

Ações de controle na cadeia secundária incluem redução da manipulação do produto, higienização correta de equipamentos e utensílios, boas práticas de fabricação, controle de tempos e temperaturas e individualização das linhas de processo de modo a evitar contaminação cruzada (BARBUT, 2015; FORSYTHE, 2013).

Para a implementação e coordenação dessas ações de controle, diversas ferramentas de gestão da segurança dos alimentos podem ser aplicadas pelas indústrias de alimentos, dentre as quais pode-se destacar: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, Procedimentos Sanitários Operacionais, e Análise de Risco (BRASIL, 2017b; FAO/WHO, 2006; TONDO; BARTZ, 2017).

A Análise de Risco é um método sistemático que compreende a Gestão de Riscos, a Avaliação de Riscos e a Comunicação de Riscos (FAO/WHO, 2006). Possui caráter preventivo, ou corretivo, baseando-se na identificação e caracterização de perigos significativos, avaliação científica da exposição, estimativa qualitativa/quantitativa da probabilidade de ocorrência de uma doença, e implementação e comunicação de medidas de controle. Em sua aplicação, as decisões são tomadas com base em argumentos científicos, com suporte em técnicas de microbiologia preditiva, a fim de garantir transparência e confiabilidade na aplicação na resolução de problemas (FAO/WHO, 2002; TONDO; BARTZ, 2017)

Aliando-se aos esforços das indústrias, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento realiza inúmeras ações para garantir o cumprimento das normas sanitárias, destacando-se o Sistema de Inspeção Federal (SIF), o Programa de Sanidade Avícola (PNSA) e o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC, ativo no controle de medicamentos veterinários). A vigilância rigorosa aliada à parceria entre indústria e avicultores contribui para a excelência técnica em todas as etapas da cadeia produtiva, reduzindo custos, garantindo a qualidade e fomentando o desenvolvimento (MAPA, 2019).

### 3.2. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* spp. é considerado o principal patógeno alimentar em nível mundial (WHO, 2015). Está presente em alimentos crus e processados, incluindo cereais, peixes e frutos do mar, vegetais, alimentos secos e alimentos crus de origem animal; suas principais fontes de contaminação são ovos crus (utilizados em produtos como a maionese caseira), aves e roedores, portadores naturais do microrganismo (TONDO et al., 2015; FORSYTHE, 2013).

*Salmonella* spp. são bacilos Gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, flagelados, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. Tratam-se de bactérias termossensíveis ( $D_{62,8} = 0,06$  minutos), geralmente não suportando temperaturas acima de 70°C; são capazes de tolerar concentrações salinas de até 9% (Jay, 2005) e sobreviver por até 300 dias no solo (BALODA, CHRISTENSEN; TRAJCEVSKA, 2001).

Condições para seu desenvolvimento abrangem temperaturas entre 5 e 46°C (ideal 35-37°C), pH entre 4 e 9 (ideal 6,5-7,5) e atividade de água ( $A_w$ ) entre 0,94 e

0,99 (sobrevivência em  $A_w < 0,2$ ) (DODD; ALDSWORTH; STEIN, 2017; DOYLE; BUCHANAN, 2012).

A salmonelose humana não tifoide é a enfermidade alimentar bacteriana com o maior número de ocorrências em nível mundial (WADAMORI; GOONERATNE; HUSSAIN, 2017). De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil, *Salmonella* spp. foi responsável por 11,3% dos 2 431 surtos com agente identificado entre 2009 e 2018 (BRASIL, 2019). Na Europa, no ano de 2017, *Salmonella* spp. foi o agente em 1 241 surtos, 24,4% do total de surtos notificados, sendo o agente detectado com a frequência mais alta (EFSA, 2018).

Os sintomas da salmonelose não tifoide incluem dores abdominais, fezes com sangue, diarreia, desidratação, febre, cefaleia, exaustão e calafrios, podendo ainda ocorrer vômito (FORSYTHE, 2013). O período de incubação no hospedeiro varia entre 16-72 horas, e a duração da enfermidade pode variar de 3 até 7 dias (CHEN et al., 2013). A dose infectante comum varia entre  $10^6$  e  $10^8$  UFC/g; No entanto, em função do grau de resistência do hospedeiro e do estado fisiológico das células bacterianas, essa dose pode ser inferior a 10 células de *Salmonella* spp. (Humphrey, 2004).

### 3.2.1. Sorovares

A *Salmonella* entérica subespécie *enterica* é responsável por 99% das infecções em seres humanos e/ou animais, e abrange mais de 2600 sorovares (ENG et al., 2015; ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014), dentre os quais prevalecem como prioritários na gestão da segurança dos alimentos os sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (CDC 2016).

A prevalência dos diferentes sorovares varia ao redor do mundo: na Europa, *S. Enteritidis* permanece como o sorovar envolvido no maior número de surtos (49,1%), à frente de *S. Typhimurium* (21,4%) e *S. infantis* (2,3%) (EFSA, 2017); No entanto, em outros países observa-se o sorovar *S. Typhimurium* estando associado à maior quantidade de surtos, como na Austrália (48,4%, seguido por *S. Enteritidis*, com 6,6%) (OZFOODNET, 2015). No Brasil, *S. Heidelberg* foi o principal sorovar identificado em carcaças de frango, seguido por *S. Minnesota* e *S. Saintpaul* (MAPA, 2018).

Outros sorovares emergentes em surtos alimentares incluem *S. Infantis*, *S. Stanley*, *S. Montevideo*, *S. Derby*, *S. Newport*, *S. Heidelberg*, *S. Schwarzengrund* e *S. Javiana* (ROBINSON, 2013; CAPALONGA, 2014; EFSA, 2013). Fatores que

contribuem para a emergência de novos sorovares causadores de surtos incluem uma rápida propagação global de clones endêmicos e a aquisição de resistência a acidez, temperatura e antibióticos (DHANANI et al., 2015; HOFFMANN et al., 2014; JARVIS et al., 2016). Tais fatores evidenciam a importância de um monitoramento contínuo com ações rápidas sobre qualquer contaminação por *Salmonella* na cadeia produtiva (ANTUNES et al., 2016).

### 3.3. Microbiologia Preditiva

A microbiologia preditiva consiste na utilização de modelos matemáticos versáteis para descrever diferentes comportamentos dos microrganismos em função de variáveis do meio. Trata-se de uma ferramenta valiosa na gestão da segurança de alimentos, tendo aplicação ao longo de toda a cadeia de produção e distribuição (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013). Os resultados obtidos através da aplicação desta tecnologia são úteis no desenvolvimento de produtos e processos, na determinação de vida útil dos produtos, na identificação de pontos críticos de controle, em treinamentos e em estudos de análise de risco (FORSYTHE, 2013).

Diferentes modelos permitem a predição da multiplicação, inativação e sobrevivência de microrganismos em diferentes condições de tempo, temperatura, pressão, contaminação inicial, pH, atividade de água e substrato, podendo ainda serem avaliados diferentes estados fisiológicos das células e interações entre microrganismos (ELIAS, 2018).

Os modelos de multiplicação são amplamente utilizados e se baseiam na curva típica de multiplicação bacteriana, conforme Figura 2. Distinguem-se seis fases, cujas durações podem variar em função de fatores intrínsecos e extrínsecos (FORSYTHE, 2013; ZWIETERING et al., 1990):

- Fase *lag*: não há multiplicação expressiva das células; as bactérias estão se adaptando ao novo ambiente sintetizando as enzimas apropriadas.

- Fase de aceleração: inicia-se uma multiplicação crescente de células; transição entre as fases *lag* e *log*.

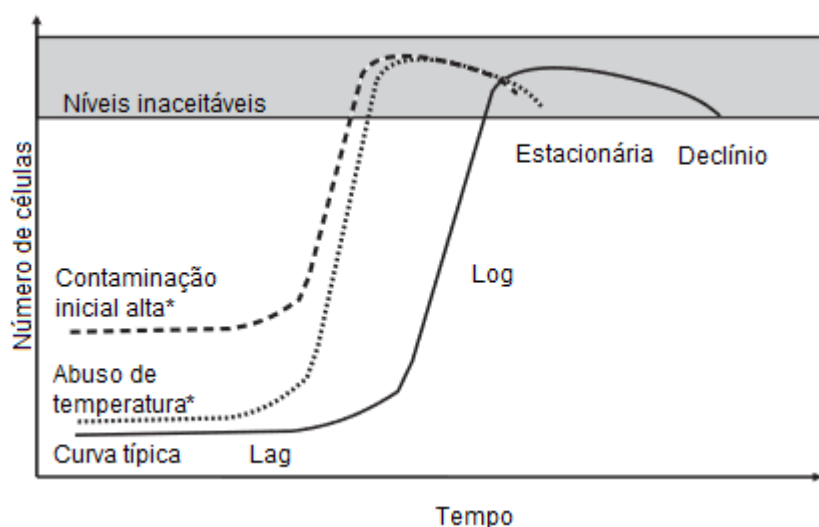
- Fase *log*: verifica-se um aumento exponencial do número de células no meio.

- Fase de desaceleração: o número de células que estão se multiplicando diminui progressivamente; transição entre as fases *lag* e estacionária.

- Fase estacionária: a taxa de geração de novas células se aproxima à de mortalidade devido ao esgotamento dos nutrientes, formação de produtos tóxicos ou variações de pH, resultando em um número de células constante ao longo do tempo. Ocorre formação de esporos devido ao estresse.

- Fase de declínio: a taxa de mortalidade supera a taxa de formação de novas células, e a população total diminui.

Figura 2. Curvas de multiplicação microbiana em função do tempo.



Fonte: adaptado de Smith, 2014.

\*Curvas de multiplicação ilustrando a redução da vida útil decorrente de abuso de temperatura ou contaminação inicial alta. Essa redução pode ser quantificada através da microbiologia preditiva.

Whiting e Buchanan (1993) propuseram uma classificação dos modelos em primários (fatores ambientais constantes), secundários (variações de fatores ambientais) e terciários (integração de modelos em softwares).

### 3.3.1. Modelos primários

Os modelos primários não levam em consideração variações do meio, como temperatura ou pH (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013). Os seguintes parâmetros são considerados: número inicial de células, taxa de multiplicação, tempo de fase lag e densidade populacional máxima (KAJAK, 2006).

O primeiro modelo proposto desse tipo foi proposto por Buchanan (1918) e previa apenas a fase exponencial, não levando em conta as demais fases. Desde então, outros métodos foram propostos, como o método Logístico e o método de Gompertz (ZWITERING et al., 1990).

Atualmente, um dos modelos mais utilizados é o proposto por Baranyi e Roberts (1994), que inclui considerações biológicas, como o parâmetro de máxima densidade celular, e que pode ser aplicado com ou sem fases lag ou estacionária (SUBRAMANIAM; WAREING, 2016). O modelo é definido pelas seguintes equações:

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

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

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

onde:

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

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

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

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

$q_0$  = parâmetro que expressa o estado fisiológico das células quando  $t=0$ ;

$t$  = tempo

$\lambda$  = tempo de fase lag (h)

### 3.3.2. Modelos secundários

Os modelos secundários permitem avaliar o efeito de parâmetros variando dentro de um intervalo, e suas alterações ao longo do tempo. A partir das velocidades de multiplicação obtidas em determinadas condições, são calculados coeficientes que predizem o comportamento dos microrganismos em condições variáveis, por exemplo, oscilações de temperatura (ao longo do transporte, armazenamento e comercialização do alimento) ou pH (alimento acidificando conforme se deteriora) (STAMATI et al., 2016).

Existem 3 tipos principais de modelos: polinomiais (superfície de resposta), Raiz Quadrada e Arrhenius.

O modelo da Raiz Quadrada (RATKOWISKY et al., 1983), é utilizado para modelar a velocidade de crescimento de microrganismos em função da temperatura. Neste modelo, são utilizados parâmetros como a temperatura mínima de multiplicação do organismo, e considera-se que há uma relação linear entre a raiz quadrada da taxa

de multiplicação e a temperatura (PEREZ-RODRIGUEZ; VALERO, 2013). Sua fórmula é descrita a seguir:

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b \cdot (T - T_{\min}) \quad (4)$$

Onde:

$\sqrt{\mu_{\max}}$  = taxa máxima de multiplicação específica

$b$  = constante

$T$  = temperatura

$T_{\min}$  = temperatura mínima teórica em que a multiplicação é detectada.

A equação de Arrhenius é muito utilizada para estimar parâmetros de reações químicas ou enzimáticas. Para sua aplicação como modelo secundário na microbiologia preditiva, é feita a consideração de que a velocidade de multiplicação microbiana é controlada pela velocidade limite de uma única reação enzimática (WHITING; BUCHANAN, 1997), conforme segue:

$$k = a * \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) \quad (5)$$

Onde:

$k$  = parâmetro de crescimento do modelo ( $\mu$ ,  $\lambda$  ou  $A$ );

$a$  = parâmetro obtido pelo ajuste do modelo ( $h^{-1}$ );

$T$  = temperatura absoluta (K);

$Ea$  = energia de ativação para crescimento bacteriano ( $kJ.mol^{-1}$ );

$Ra$  = constante universal dos gases ( $8,314 J.K^{-1}.mol^{-1}$ ).

Os modelos polinomiais se baseiam no ajuste matemático das curvas de multiplicação, sem motivação biológica específica. Polinômios de diferentes ordens podem ser utilizados: polinômios de ordens mais elevadas proporcionam um melhor ajuste, porém podem levar a resultados que não fazem sentido biológico; um exemplo desse fenômeno seria um aumento local inesperado da taxa de multiplicação ligado a um aumento da concentração salina (SUBRAMANIAM; WAREING, 2016).

### 3.3.3. Modelos terciários



São considerados modelos terciários as ferramentas computacionais que permitem transformar modelos primários e secundários em interfaces amigáveis, em que o usuário pode comparar diferentes efeitos de condições de multiplicação e comparar comportamentos dos microrganismos. (WHITING, 1995).

Entre os diversos *softwares* disponíveis atualmente, cita-se (DANNENHAUER, 2012):

- USDA's Pathogen Modeling Program (PMP), desenvolvido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos;
- Food MicroModel, desenvolvido por um grupo de empresas em conjunto com o governo do Reino Unido;
- ComBase Predictor, desenvolvido pelo Institute of Food Research do Reino Unido;
- Food Safety Spoilage Predictor, desenvolvido pela Technical University of Denmark, Dinamarca;
- Food Product Modeller, software desenvolvido pelo órgão MIRINZ, que é ligado ao governo da Nova Zelândia.

Dentre elas, a ferramenta ComBase Predictor se destaca por apresentar uma interface amigável ao usuário, possibilitando a fácil aplicação. O *software* tem como foco descrever e prever como os microrganismos sobrevivem e se multiplicam sob diversas condições de alimentos (pH, aW, temperatura etc.). Além de disponibilizar recursos para ajuste de dados, dentre os modelos mais utilizados em microbiologia preditiva. Podendo ser aplicado no planejamento de experimentos, para estimar a contagem bacteriana em um determinado tempo, ou ainda, diretamente em processos industriais, auxiliando na tomada de decisões com base em segurança e qualidade.

Aliando bases de dados robustas e redes neurais, modelos de predição cada vez mais promissores e precisos vêm sendo desenvolvidos, os quais necessitam de validação experimental em matrizes alimentícias para garantir sua confiabilidade como balizadores de medidas de controle (ELIAS, 2018).

Diversos autores avaliaram a taxa de multiplicação de *Salmonella* spp. utilizando modelos terciários; Domingues e Schaffner (2008) encontraram valores, em  $\Delta \log$  UFC/h, de aproximadamente: 0,01 a 10°C, 0,15 a 20°C, 0,50 a 28°C e 1,00 a 37°C para *S. Kentucky* e *S. Typhimurium* em carne de frango crua. Oscar (1999), por sua vez, relatou valores, em  $\Delta \log$  UFC/h, de aproximadamente: 0,02 a 10°C, 0,22°C a 20°C, 0,46 a 28°C e 0,73 a 37°C para *S. Typhimurium* em peito de frango cozido.

Borneman, Ingham e Cécile (2009) obtiveram valores, em  $\Delta \log$  UFC/h, de aproximadamente 0,024 para 10°C, 0,174 para 21,1 °C, 0,636 para 26,7°C e 0,972 para 37,8°C para carne de peru.

Os estudos encontrados não avaliam *pools* de diferentes sorovares em carne de frango; além disso, limitam-se a avaliar apenas o peito do frango isoladamente, evidenciando a necessidade de mais estudos nessa área. O progresso no desenvolvimento de modelos preditivos fornecerá subsídios de grande valor à implementação de ferramentas de Análise de Risco e à elaboração de normativas relacionadas à segurança dos alimentos.

Os materiais e métodos, resultados e discussão desse trabalho serão apresentados a seguir, em forma de artigo científico.

#### 4. ARTIGO

Assessment of *Salmonella* spp. growth on chicken exposed to isothermal and non-isothermal conditions

João Pedro Sequeira Pessoa <sup>1</sup>, Claudia Titze Hessel <sup>1</sup>, Susana de Oliveira Elias <sup>1</sup>, Elis Regina Gomes Alfama <sup>2</sup>, Eduardo Cesar Tondo <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICTA/UFRGS. Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale – Prédio 43212, Laboratório 205 – CEP 91501-970 - Porto Alegre/RS/Brasil.

<sup>2</sup> Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS. Avenida Ipiranga, 6681 - Prédio 81 – 6º andar – sala 603 – CEP 90619-900 - Porto Alegre/RS/Brasil.

#### **Abstract**

Chicken production represents great impact in Brazilian economy, as the country leads world exports. Product quality and safety at consumer level depends on efforts among different sectors involving the entire production chain and using robust food safety management tools. Predictive microbiology allows to describe microorganism's behavior in a specific food matrix exposed to different conditions, as temperature, pH, pressure, among others. In this study, raw chicken breast meat-skin samples were artificially contaminated with *Salmonella* spp. pool in order to evaluate bacteriological growth at different temperatures. The pool consisted of five *Salmonella* serovars which represent the most important serovars for Brazilian chicken industry. Primary and Secondary models were developed through storage under isothermal conditions. Results showed no growth at 5°C. At 7, 15, 25, 37 and 45°C lag times were 103.86±15.59h, 6.95±2.27h, 1.99±0.47h, 0.55±0.43h e 0.96±0.39h, respectively. Final population and time to reach maximum *Salmonella* concentration were 4.90±0.08 CFU/g in 317 h (7°C); 7.5±0.08 CFU/g in 72 h (15°C); 9.19±0.07 CFU/g in 31 h (25°C); 8.52±0.10CFU/g in 15 h (37°C); 7.63±0.11CFU/g in 12 h (45°C). Secondary model was suitable to describe *Salmonella* growth in any temperature between 7 and 45°C,

well-adjusted with determination coefficient and root mean square error of 0.97 and 0.029, respectively. Dynamic modeling of *Salmonella* growth was validated through non-isothermal conditions in an extreme time-temperature abuse scenario, displaying an overall good performance (RMSE of 0.18, Bias of 1.11 and Accuracy of 1.26). Hence, the developed model for *Salmonella* spp. is suitable to predict growth in raw chicken breast meat-skin combination exposed to temperatures ranging from 7 to 45 °C.

Keywords: raw chicken, foodborne pathogens, predictive microbiology, growth models.

## 1. Introduction

An increasing population and advances in globalization have led to a growth in poultry trade sector over the world (FAO/WHO, 2019b). Brazil plays an important role in this market, because the country is currently leading world's chicken exports, reaching over 4 million tons of in 2018. Brazil occupies the third position as chicken producer, only behind the US and China, respectively ca).

Chicken production and distribution chain involves several steps, from farm production, transport, slaughter processing, packaging and storage, selling in supermarkets, handling and preparation, cooking to consumption. Each step must be well controlled in order to obtain a safe product at consumer level (FAO/WHO, 2019b). Consumer awareness on correct food safety practices at home are mostly related to management of the binomial time-temperature. Thus, these parameters are essential to be controlled in order to assure product quality and safety (Hessel et al., 2019).

In Europe, *Salmonella* spp. was the most frequently detected foodborne pathogen in 2017, responsible for 24.4% of notified outbreaks (EFSA, 2018). In October 2019, US recorded the largest number of outbreaks tied to *Salmonella* spp. after contact with backyard poultry (CDC, 2017). According to the latest report provided by Brazilian Ministry of Health, from 2009 to 2018 there were reported 6.809 foodborne outbreaks. Most of them occurred at residences (37.2%) and restaurants (16.0%) and *Salmonella* spp. was responsible for 11.3% of all registered foodborne outbreaks in this period (ANVISA, 2019). Supporting this fact, chicken can represent a major source of *Salmonella* for humans and the microorganism generally is located at surface level of carcasses (Forsythe, 2013; Jay, 2005). As reported by May (1962), microbial counts on surfaces increase over the steps of processing chain.

Even with all the efforts from companies, chicken meat can still be contaminated by *Salmonella*. Hence, it is necessary to apply sophisticated tools to support food safety management inside chicken production chain. Among those tools, predictive microbiology stands out as an important method to provide data and estimate the sum of microbial increases and inactivation through various stages in the farm to-fork-continuum. Since microorganism behavior varies according to food properties along with external conditions, it can be used to quantitatively describe the effect of these

properties in growth and inactivation of the microorganism in food. Along with Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) and Quantitative Microbiological Risk Assessment (QMRA) they can be described as the food safety triangle (Brul, Van Gerwen, & Zwietering, 2007; Nakashima, André, & Franco, 2000; Oliveira et al., 2013).

This study aimed to develop growth models to predict and simulate *Salmonella* spp. behavior on chicken meat under isothermal and non-isothermal conditions, considering time, temperature and serovars commonly found in Brazilian production chain.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Stock cultures**

A bacterial pool including five *Salmonella* spp. isolates belonging to serovars of great importance to Brazilian chicken industry were selected to collect kinetic data. The isolates were *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Saintpaul and *Salmonella* Infantis. Before experiments, isolates were maintained at -18°C in Brain Heart Infusion broth (BHI; Accumedica, USA) supplemented with 20% glycerol.

### **2.2. Inoculum preparation**

Each *Salmonella* isolate was separately grown under aerobic conditions in Brain Heart Infusion broth at 37°C for 18-24 hours; this step was conducted twice. After incubation, 1 mL of each isolate was used to compose a 5mL pool, then centrifuged at 4°C for 10 min (3500 RPM) (CIEN TEC CT-5000 R, Brazil), the supernatant was discharged and the pellet was washed with 0.1% peptone water (w/w) (Oxoid, UK). After repeating this procedure three times, the inoculum was re-suspended with 0.1% peptone water (w/w). Next, it was adjusted through optical density 0.5 (OD<sub>630nm</sub>) (Ultrasp<sup>™</sup> 3100 pro, Amersham Biosciences, UK) until reach 10<sup>8</sup> CFU/mL.

Decimal serial dilutions were carried out with 0.1% peptone water (w/w) to reach an initial concentration of approximately 10<sup>2</sup> CFU/g on chicken meat. The final concentration was confirmed by plating on Xylose Lysine Desoxycholate agar (Oxoid, UK).

### **2.3 Sample determination and preparation**

In the present study, samples were composed of chicken breast meat and skin, aiming to represent a more realistic scenario found in chicken industry. Chicken breast with skin were bought in local supermarkets in Porto Alegre, the capital city of the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. For each experiment, samples were obtained from a single piece of chicken breast. Hence, a trial test was carried out in order to determine meat-skin ratio on the average chicken breast weight commonly sold. Once established, this sample ratio was followed in experimental design. Also, the pH (Q400AS, Quimis, Brazil) and water activity (AquaLab 3TE, Decagon Devices, USA) of chicken samples were determined.

Predictive models which inactivate chicken microbiota have been reported by Oscar (2002) and Juneja et al., (2007). In this study chicken did not undergo any decontamination treatment. It allowed to keep natural background microbiota influence under *Salmonella* growth, portraying a scenario closer to reality. Therefore, 10 g of raw chicken breast meat-skin combination were separately placed into sterile plastic bags.

## **2.4 Experimental design for isothermal conditions**

### **2.4.1 Incubation and bacterial enumeration**

After decimal dilutions, 1 mL of the pool was inoculated into the surface of the chicken samples. The bags were kindly pressed, in order to spread the inoculum over the chicken meat. Samples were incubated in a BOD chamber (Model SL-200; Solab; Piracicaba, Brasil) at constant temperatures of 5, 7, 15, 25, 37 and 45°C, as *Salmonella* growth may occur from refrigeration temperatures (~5°C) up to >40°C (Forsythe, 2013). Microbial count was evaluated over time until reaching stationary phase. To enable microbial count, 90 mL of 0.1% peptone water (w/w) were added to each sample and they were mixed using a stomacher (Stomacher® 400, Seward, England) for 2 min. Next, samples were plated onto a nonselective medium (Plate Count Agar; PCA; KASVI, Brazil) and a selective medium (XLD) combined with a thin upper layer of PCA. Plates were incubated at 37°C for 24 h. For each temperature, experiments were repeated at least twice, sampling was carried out in triplicate and microbial counts was expressed as log CFU/g.

### **2.4.2 Model fitting**

Baranyi and Roberts (1994) primary predictive model was used in this study. It directly derives from experimental data and express cell count variation over time (Brul et al., 2007; Pérez-Rodríguez & Valero, 2013). Among other primary models described in literature, Baranyi and Roberts's was selected because it displayed an overall good response to fit data within the different bacterial growth curve phases (Juneja et al., 2007). Experimental data was adjusted to model through DMFit tool, available in software ComBase Predictor (<https://www.combase.cc/index.php/en/>). Thus, maximum growth rate ( $\mu_{max}$ ), lag time ( $\lambda$ ), and maximum population density ( $N_{max}$ ) were expressed solving the following equations (1-3):

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

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

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

where:  $\ln(N(t))$  = ln of cell concentration at a certain time (h) (CFU/g);  $\ln(N_0)$  = ln of initial cell concentration (CFU/g);  $\mu_{max}$  = specific growth rate (log CFU/g/h);  $\ln(N_{max})$  = ln of maximum cell concentration;  $q_0$  = parameter expressing the initial physiological state of cells;  $\lambda$ =lag time (h).

Once established growth parameters in primary model, secondary model was developed. Ratkowsky et al. (1983) model was applied in this study. It mathematically describes temperature-dependence parameters in equations (Brul et al., 2007). Maximum growth rate was predicted in any temperature within experimental observed range, by solving the following equation:

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min}) \quad (4)$$

where:  $\sqrt{\mu_{max}}$  is the square root of maximum growth rate; b is a constant obtained from linear regression of temperature versus maximum growth rate; T (°C) is temperature and  $T_{min}$  (°C) is a conceptual minimum temperature for microbial growth.

## 2.5 Experimental design for non-isothermal conditions

### 2.5.1 Incubation and bacterial enumeration

Aiming to validate predictive secondary model, chicken was submitted to non-isothermal conditions and results were analyzed in contrast with the equation developed. Sampling design follow the same as described for isothermal conditions



(see section 2.4.1.), except on experimental data, which was collected once in triplicate. A five-step scenario was built simulating real conditions: transport from industry to distribution center (24.7°C for 8.5 h); storage in the supermarket (12.4°C for 24 h); transport from supermarket to residence (29.8°C for 2 h); storage at consumer residence (11°C for 36h); storage during handling (35°C for 6h). These steps were designed to simulate time-temperature abuse conditions, wherein the first three steps were previously evaluated by Hessel (2019; non-published study) displaying real data from Brazilian chicken production chain.

### 2.5.2 Model fitting

In view of assess bacteria growth within different temperatures profiles a non-isothermal model was set. Only temperature changed over time, while other parameters were considered constant. Baranyi et al. (1995) tested a dynamic growth model at changing temperatures. His model was applied to validate secondary model compared with experimental data in this study. Growth dynamics can be described as the following equations (6,7)

$$\frac{d}{dt}q = \mu_{max}q \quad (5)$$

$$\frac{d}{dt}x = \mu_{max} \frac{q}{1+q} \left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right) x \quad (6)$$

where:  $q$  is related to the amount of critical compounds needed for growth;  $\mu_{max}$  represent the maximum growth rate;  $x_{max}$  is the maximum bacterial concentration;  $x(t)$  is the time-dependent bacterial concentration.

The equations were solved with parameters obtained from secondary model. MATLAB® version R2016b (Mathworks, Natick, USA) was used to solve the equations through Runge-Kutta (2,3) pair of Bogacki and Shampine method.

### 2.6. Model evaluation

Isothermal models goodness-of-fit were evaluated through coefficient of determination ( $R^2$ ) and Root Mean Square Error (RMSE).  $R^2$  express the rate of the variance in dependent variable predictable from independent variable. RMSE measures discrepancy between observed and predicted values (Brul et al., 2007; D. Ratkowsky, 2003). Non-isothermal model performance was evaluated through bias, accuracy and RMSE, as described by Baranyi et al. (1995). Also, when pertinent, Tukey's test (95% confidence) was carried out to determine statistical difference

between cases. These analyses were performed using Microsoft Excel 360 software. Further, ComBase Predictor was used for comparison with developed models in this study. The software can generate predictive growth parameters from experimental data obtained in different broths or foods, while setting intrinsic parameters (temperature, pH, water activity). Aw and pH were the same experimentally determined for chicken. As for initial concentration, it was set according to experimental data for each growth curve.

### 3. Results

#### 3.1 Sample size, pH and water activity

In the present study, samples were defined as chicken breast meat-skin combination, considering that skin stays attached to meat throughout processing and contamination is more prevalent at surface level (JAY, 2005; FORSYTHE, 2013). A prior trial test on the average chicken weight revealed a chicken skin meat-skin ratio of 9:1. pH and water activity were  $5.960 \pm 0.050$  and  $0.994 \pm 0.002$ , respectively. Results showed no statistical difference when compared pH and water activity of samples composed of meat and meat-skin (Tukey's test,  $p > 0.05$ ). It could indicate that composition showed no influence under those parameters, which are important in the evaluation of bacterial growth (JAY, 2005).

#### 3.2 Isothermal growth

At 5°C no *Salmonella* growth was observed over time (~500h). Mesophilic count increased until reaching  $9.43 \pm 0.57$  CFU/g at 295h, when it started to decrease. At this point, visible and organoleptic signs of spoilage could already be observed. These are usually related to microbial consumption of meat nutrients (Ercolini, Russo, Nasi, Ferranti, & Villani, 2009). Although mesophilic bacteria are usually present on fresh chicken, when it reaches spoilage condition psychrotrophic can be prevalent. These microorganisms can grow at refrigeration temperatures and have an optimum growth temperature between 20 and 30 °C (Russell, Fletcher, & Cox, 1995). It could indicate that present psychrotrophic microorganisms on chicken were prevalent over the initial *Salmonella* inoculum (2.2 CFU/g), as counts did not increase over time. Hence, the temperature of 5°C was not included in the built of secondary predictive model, as growth parameters could not be estimate.

Isothermal growth curves for chicken stored at constant temperatures of 7, 15, 25, 37 and 45°C are shown in Figure 1. Average *Salmonella* initial population ranged from 2 to 2.5 CFU/g. As for final population, it depended on the temperature, reaching over 8 CFU/g for 25 and 37°C; around 7.5 CFU/g for 15°C and 45°C; around 4.9 CFU/g for 7°C (Table 1). Time to reach maximum *Salmonella* concentration were 317 h (7°C); 72 h (15°C); 31 h (25°C); 15 h (37°C) and 12 h (45°C). At 7°C, mesophilic initial population started at ~5 CFU/g reaching over 8 CFU/g at the final time. At 269 h (7°C), *Salmonella* could not growth more than ~5 CFU/g, which was the initial mesophilic count, indicating that *Salmonella* population may not be able to suppress and compete over a high initial background microbiota. Primary model goodness-of-fit was evaluated through  $R^2$ , showing an overall good fit of over 0.99 for tested temperatures, except 7°C (0.98). This is expected since a longer growth curve would require more samples in order to better fit data. It did not occur since all data (in each experiment) were extract from the same chicken breast.

Secondary model could predict *Salmonella* maximum growth in any temperature ranging from 7 to 45°C. Equation was well-adjusted with determination coefficient and root mean square error of 0.97 and 0.029, respectively (Table 2). When compared the developed model and ComBase model, similar predicted curves could be generated. As the model proven to be suitable to describe *Salmonella* growth on chicken breast meat-skin combination it can be used to practical purposes inside chicken process. Predictive microbiology is foreseen in Portaria N° 74 de 2019, an update on Portaria N° 210 de 1998, Brazilian legislation on “Technical Regulation of the Technological and Hygienic-Sanitary Inspection of Poultry Meat” (MAPA, 2019). Thus, secondary model described in this study could be applied to provide data and help chicken industries to predict *Salmonella* growth according time-temperature conditions during process.

### 3.3 Non-isothermal growth

As demonstrated in Figure 2, non-isothermal experimental microbial growth curve phases showed the same behavior estimated by the secondary model. The scenario was designed to validate secondary model capability to predict growth while changing temperatures. In the simulated abuse scenario *Salmonella* was able to reach maximum growth (over 8 CFU/g). It was expected as these conditions combined are extreme and overestimate most consumers and industry observed time-temperature

usual practices (HESSEL, non-published; HESSEL et al., 2019). At changing temperatures, the predicted parameters fit experimental data presenting a RMSE of 0.18, Bias of 1.11 and Accuracy of 1.26. Performance indices could lead to a good status of assurance on predictions of the model (Ross, 1996).

#### 4. Conclusion

The developed model for *Salmonella* spp. is suitable to predict growth in raw chicken breast meat-skin combination exposed to temperatures ranging from 7 to 45 °C. Besides, no growth was observed at 5°C, indicating that at this temperature product could be safely stored for a longer period. The model developed in this study is in accordance with Brazilian latest updates in poultry industry legislation. It could serve as a tool to support both industry and government, assuring well controlled time-temperature parameters based on scientific data.

#### 5. References

- ANVISA. (2019). *Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Informe 2018*. Brasil.
- Baranyi, J., Robinson, T. P., Kaloti, A., & Mackey, B. M. (1995). Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00154-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00154-X)
- Baranyi, József, & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)
- Brul, S., Van Gerwen, S. J. C., & Zwietering, M. H. (2007). *Modelling Microorganisms in Food. Modelling Microorganisms in Food*. <https://doi.org/10.1533/9781845692940>
- CDC. (2017). Multistate Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Linked to Live Poultry in Backyard Flocks, 2017 (Final Update).

- EFSA. (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5500>
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., & Villani, F. (2009). Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02762-08>
- FAO/WHO. (2019a). Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets.
- FAO/WHO. (2019b). Gateway to poultry production and products. Retrieved from <http://www.fao.org/poultry-production-products/socio-economic-aspects/poultry-chain/en/>
- Forsythe, S. J. (2013). *The microbiology of safe food. The Microbiology of Safe Food*. <https://doi.org/10.1002/9780470999431>
- Hessel, C. T., de Oliveira Elias, S., Pessoa, J. P., Zanin, L. M., Stedefeldt, E., & Tondo, E. C. (2019). Food safety behavior and handling practices during purchase, preparation, storage and consumption of chicken meat and eggs. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108631>
- Jay, J. M. (2005). *Modern Food Microbiology. Modern Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-6480-1>
- Juneja, V. K., Valenzuela Melendres, M., Huang, L., Gumudavelli, V., Subbiah, J., & Thippareddi, H. (2007). Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. *Food Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.08.004>
- MAPA. (2019). *Portaria N° 19 de 2019. Technical Regulation of the Technological and Hygienic-Sanitary Inspection of Poultry Meat*.

- MAY, K. N. (1962). Bacterial contamination during cutting and packing chicken in processing plants and retail stores. *Food Technology*, 16, 89–91.
- Nakashima, S. M., André, C. D. S. de, & Franco, B. D. G. de M. (2000). Revisão: aspectos básicos da Microbiologia. *Brazilian Journal of Food Technology*.
- Oliveira, A., Silva, C., Rezende, M., Sola, M. C., Feistel, J. C., & Oliveira, J. J. (2013). Microbiologia Preditiva. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*.
- Oscar, T. P. (2002). Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the potential growth of *Salmonella typhimurium* on cooked chicken. *International Journal of Food Microbiology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00025-9)
- Pérez-Rodríguez, F., & Valero, A. (2013). *Predictive microbiology in foods. Predictive Microbiology in Foods*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5520-2>
- Ratkowsky, D. (2003). Model Fitting And Uncertainty. <https://doi.org/10.1201/9780203503942.ch4>
- Ratkowsky, D. A., Lowry, R. K., McMeekin, T. A., Stokes, A. N., & Chandler, R. E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology*.
- Ross, T. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03539.x>
- Russell, S. M., Fletcher, D. L., & Cox, N. A. (1995). Spoilage bacteria of fresh broiler chicken carcasses. *Poultry Science*. <https://doi.org/10.3382/ps.0742041>

Table 1. Growth kinetic parameters of *Salmonella* pool experimentally evaluated on chicken breast meat-skin and calculated on ComBase Predictor models at different temperatures.

Growth parameters	Model	Temperature (°C)				
		7	15	25	37	45
$\mu_{\max}^a$	Chicken breast meat <i>Salmonella</i> pool	0.016 ± 0.002	0.123 ± 0.008	0.376 ± 0.011	0.672 ± 0.036	0.8 ± 0.058
$\lambda^a$		103.861 ± 15.592	6.954 ± 2.266	1.994 ± 0.470	0.548 ± 0.434	0.956 ± 0.394
$N_{\max}^a$		4.899 ± 0.084	7.5 ± 0.080	9.187 ± 0.066	8.524 ± 0.097	7.631 ± 0.113
$\mu_{\max}$	ComBase	0.014	0.096	0.455	0.873	N.D
$\lambda$		102.37	14.93	3.15	1.64	N.D
FP		8.52	8.52	8.52	8.52	N.D

$\mu_{\max}$ : max growth rate (log CFU/g/h);  $\lambda$ : lag time (h);  $N_{\max}$ : final population (log CFU/g); N.D: not determined; software could not estimate experimental temperature.

<sup>a</sup> Mean value of triplicate trials.

Table 2. Secondary model described by square root equation expressing growth rate as a function of temperature, comparing *Salmonella* growth on chicken breast and ComBase Predictions Models.

	Secondary Model	$R^2$	RMSE
Chicken breast meat	$\sqrt{\mu} = 0.0204(T+1.647)$	0.97	0.029
ComBase	$\sqrt{\mu} = 0.028(T-2.843)$	0.99	0.014

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

Figure 1. Isothermal growth curves of *Salmonella* pool (●) and mesophilic (▲) natural microbiota on chicken breast with skin, fitting data to DMFit from Combase software.

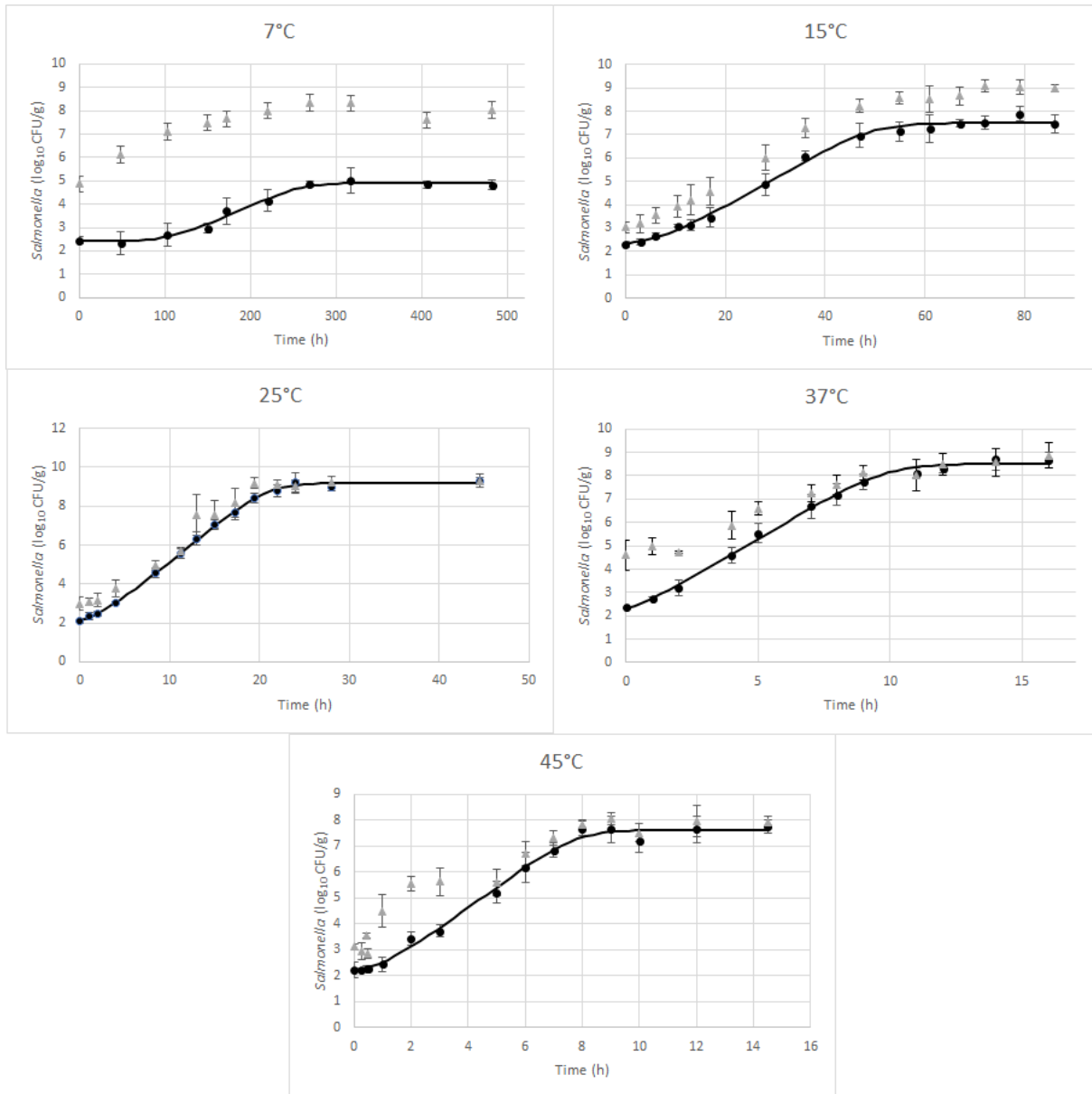
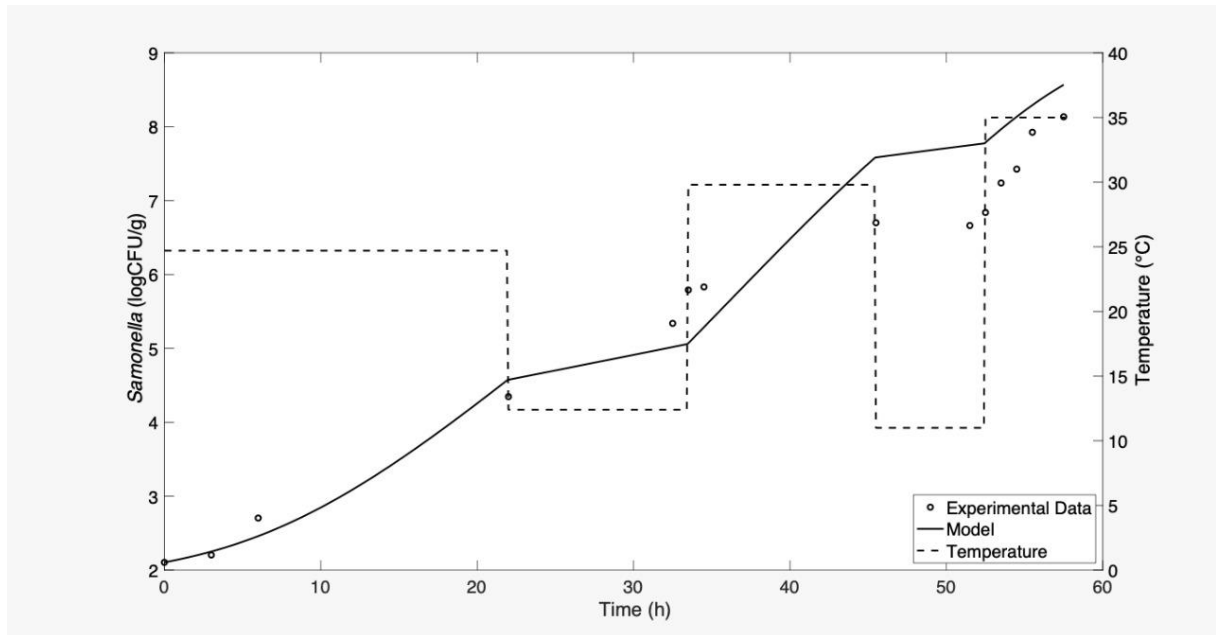




Figure 2. Non-isothermal growth curves of *Salmonella* on chicken breast with skin experimentally observed versus predicted in Baranyi model derivate from isothermal conditions.



## 5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista a importância estratégica que o Brasil detém no cenário mundial de comércio de carnes de corte, foram construídas curvas de multiplicação de *Salmonella* a fim descrever matematicamente o comportamento do microrganismo em carne de frango.

Primeiramente foram identificados estudos similares, a fim de contemplar o melhor contexto de inovação científica aliado a uma boa representação das condições do cenário brasileiro. O inóculo foi definido com um *pool* contemplando os principais sorovares *Salmonella* prevalentes na cadeia brasileira e de importância a nível mundial.

Foram desenvolvidos modelos primários, a partir de curvas de multiplicação isotérmicas. Sendo possível obter parâmetros de multiplicação, bem como avaliar qualitativamente a influência da microbiota acompanhante nas temperaturas testadas. Foi observado que a temperaturas mais baixas a microbiota acompanhante exerce grande influência, no sentido de competir com a multiplicação do inóculo inicial do patógeno. A partir dos parâmetros obtidos, foi possível construir o modelo secundário, permitindo prever a multiplicação do patógeno em temperaturas não testadas experimentalmente, desde que dentro do intervalo de temperaturas. O modelo secundário foi validado através de experimentos em condições não-isotérmicas, apresentando bons índices de adequação frente a um cenário experimental construído por meios de dados reais da cadeia de frango. Uma vez que os valores estimados seguem a tendência de dados experimentais, o modelo se mostra adequado para uso, com boa confiabilidade na predição.

O desenvolvimento de modelos matemáticos para predição de multiplicação de microrganismos pode ser uma ferramenta muito útil na gestão da segurança de alimentos. Nesse estudo, o contexto de construção dos modelos considerou as principais características presentes no cenário nacional, bem como diferenciais frente a modelos já existentes na literatura. A composição de amostra contendo carne e pele, enquanto mantida as características frango *in natura*, ou seja, sem alteração na microbiota acompanhante, tornam o modelo adequado para descrever situações reais encontradas na cadeia de produção de frango. As aplicações são as mais diversas e

vão ao encontro dos requerimentos das atualizações de legislações no setor de aves, como é o caso da Portaria N° 19 de 2019 (MAPA), que viabiliza o uso de microbiologia preditiva para validar cenários de tempo-temperatura nos programas de autocontrole das indústrias. Ainda, os modelos podem ser empregados em estudos de avaliação quantitativa de risco, fornecendo ferramentas para tomadas de decisões assertivas, com base em estudos científicos.

Assim, os resultados do presente trabalho podem favorecer toda cadeia produtiva de frango. O desenvolvimento de pesquisas direcionadas para atender as demandas da sociedade auxiliam no fortalecimento do elo entre universidade, indústria e governo. O mercado torna-se mais forte e competitivo a nível mundial, enquanto o governo se beneficia com ferramentas que auxiliem na gestão de políticas para obtenção de alimentos com maior qualidade e segurança a nível do consumidor.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABPA. 2016. Relatório Anual 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>. Acesso: 27 de outubro de 2019.
- ALEXANDRATOS, Nikos; BRUINSMA, Jelle. **World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision**. 2012.
- ANTUNES, Patrícia et al. *Salmonellosis: the role of poultry meat*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110-121, 2016.
- BALODA, Suraj B.; CHRISTENSEN, Lise; TRAJCEVSKA, Silvija. Persistence of a *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* DT12 Clone in a Piggery and in Agricultural Soil Amended with *Salmonella*-Contaminated Slurry. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 6, p. 2859-2862, 2001.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International journal of food microbiology**, 23(3-4), 277-294, 1994.
- BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, v. 139, n. 7-E, 2001.
- BRASIL. Nota Informativa nº192-SEI/2017-CGDT/DEVIT/SVS/MS e Sistema Informação de Agravos de Notificação (Sinan). 2017a.
- BRASIL. **Decreto N°9013 de 29 de março de 2017 -Regulamenta a Lei no1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei no7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. 2017b.
- BRASIL. 2019. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/>

pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf. Acesso em: 03 de novembro de 2019.

BHUNIA, Arun K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. Springer, 2018.

BUNCIC, S.; ANTIC, D.; BLAGOJEVIC, B. Microbial ecology of poultry and poultry products. **Quantitative Microbiology in Food Processing: Modeling the Microbial Ecology**, p. 483-498, 2017.

BUNCIC, Sava; SOFOS, J. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food research international**, v. 45, n. 2, p. 641-655, 2012.

BUCHANAN, R.E. Life Phases. **The Journal of Infectious Diseases**, 23(2), 109-125, 1918.

BUCHANAN, R.L.; WHITING, R.C.; DAMERT, W.C. When is simple good enough: A comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. **Food Microbiology**, v.14, p.313-326, 1997.

CAPALONGA, Roberta et al. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 7, p. 811-817, 2014.

COX, N. A. et al. Bacterial contamination of poultry as a risk to human health. **Food safety control in the poultry industry**. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, United Kingdom, p. 21-35, 2005.

CDC. 2016. Seven Multistate Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Linked to Live Poultry in Backyard Flocks. Disponível em <http://www.cdc.gov/Salmonella/live-poultry-05-16/index.htm>. Acesso em 3 de novembro de 2019.

CHEN, Hung-Ming et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. **Pediatrics & Neonatology**, v. 54, n. 3, p. 147-152, 2013.

DANNENHAUER, Cristiano Édio et al. Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva. 2012. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/93671>. Acesso em 03 de novembro de 2019.

BORNEMAN, Darand L.; INGHAM, Steven C.; ANE, Cecile. Mathematical approaches to estimating lag-phase duration and growth rate for predicting growth of *Salmonella* serovars, *Escherichia coli* O157: H7, and *Staphylococcus aureus* in raw beef, bratwurst, and poultry. **Journal of food protection**, v. 72, n. 6, p. 1190-1200, 2009.

DE CESARE, Alessandra. *Salmonella* in Foods: A Reemerging Problem. In: **Advances in food and nutrition research**. Academic Press, 2018. p. 137-179.

DHANANI, Akhilesh S. et al. Genomic comparison of non-typhoidal *Salmonella* enterica serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky isolates from broiler chickens. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128773, 2015.

DODD, Christine ER; ALDSWORTH, Tim Grant; STEIN, Richard A. (Ed.). **Foodborne diseases**. Academic Press, 2017.

DOMINGUEZ, Silvia A.; SCHAFFNER, Donald W. Modeling the growth of *Salmonella* in raw poultry stored under aerobic conditions. **Journal of food protection**, v. 71, n. 12, p. 2429-2435, 2008.

DOYLE, Michael P.; BUCHANAN, Robert L. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. American Society for Microbiology Press, 2012.

DUNKLEY, K. D. et al. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 15, n. 1-2, p. 26-35, 2009.

EFSA. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. **EFSA Journal**, v. 9, n. 4, p. 2105, 2011.

EFSA. Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry). **EFSA Journal**, v. 10, n. 6, p. 2741, 2012.

EFSA & ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, v. 16, n. 12, p. e05500, 2018.

ELIAS, Susana de Oliveira. **Avaliação Quantitativa do Risco de *Salmonella* spp. e de *Escherichia coli* O157:H7 em Alface no Rio Grande do Sul.** 2018. 154 f. Tese (Doutorado) - Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Icta, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

ENG, Shu-Kee et al. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284-293, 2015.

FAO/WHO. **Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets.** Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2019.

FAO/WHO. **Food safety risk analysis: a guide for national food safety authorities.** Report of a joint FAO/WHO meeting Rome, Italy, p. 29-30, 2006.

FAO/WHO. **Microbiological Risk Assessment Series 2 - Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens.** 2002.

FORSYTHE, S. J. 2013. Microbiologia da Segurança dos Alimentos. Artmed.

FSANZ. 2005. Scientific Assessment of the Public Health and Safety of Poultry Meat in Australia. Food Safety Australia and New Zealand. Disponível em: [http://www.foodstandards.govt.nz/code/primaryproduction/poultry/documents/P282\\_Poultry%20\\_%20DAR%20Attach3.pdf](http://www.foodstandards.govt.nz/code/primaryproduction/poultry/documents/P282_Poultry%20_%20DAR%20Attach3.pdf). Acesso em: 03 de novembro de 2019.

HOFFMANN, Maria et al. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *Salmonella* enterica serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. **Genome biology and evolution**, v. 6, n. 5, p. 1046-1068, 2014.

HUMPHREY, Tom. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 504, 2004.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, p. 526–530, 2014.

JARVIS, N.A., O'BRYAN, C.A., DAWOUD, T. M., PARK, S.H., KWON, Y.M, CRANDALL, P.G., RICKE, S.C. An overview of *Salmonella* thermal destruction during food processing and preparation. **Food Control**, v. 68, p. 280–290. 2016. doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.006

JAY, James M.. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

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

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 713-721, 2012.

MAPA. Boletim Interno. 2018.



MAPA. 2019. Exportação. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/exportacao>. Acesso em 27 de outubro de 2019.

NINIOS, Thimjos et al. (Ed.). **Meat inspection and control in the slaughterhouse**. Wiley Blackwell, 2014.

OSCAR, Thomas P. Response surface models for effects of temperature and previous growth sodium chloride on growth kinetics of *Salmonella Typhimurium* on cooked chicken breast. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 12, p. 1470-1474, 1999.

OZFOODNET. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual report of the OzFoodNet network. **Communicable diseases intelligence quarterly report**, v. 39, n. 2, p. 236, 2015. Disponível em: <https://www1.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf/Content/cda-cdi3902g.htm>. Acesso em 03 de novembro de 2019.

ROBINSON, S. The big five: Most common *Salmonella* strains in foodborne illness outbreaks. **Food Safety News**, 2013.

SMITH, Douglas P. Poultry processing and products. **Food Processing: Principles and Applications**, p. 549-566, 2014.

STAMATI, Ioanna et al. On the effect of sampling rate and experimental noise in the discrimination between microbial growth models in the suboptimal temperature range. **Computers & Chemical Engineering**, v. 85, p. 84-93, 2016.

SUBRAMANIAM, P; WAREING, P. **The Stability and Shelf Life of Food**. 2. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2016. 612 p.

TALAMINI, Dirceu João Duarte; MARTINS, Franco Müller; FILHO, Jonas Irineu Dos Santos. Conjuntura econômica da avicultura brasileira em 2018. **Embrapa Suínos e Aves-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2018. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190390/1/final9033.pdf>. Acesso em 30 de outubro de 2019.

TONDO, Eduardo César; BARTZ, Sabrina. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2017. 263 p.

TONDO, E.C.; RITTER, A.C.; CASSARIN, L.S. Involvement Foodborne Outbreaks, Risk Factors and Options to Control *Salmonella Enteritidis* SE86: An Important Food Pathogens in Southern Brazil. In Hackett CB, editor. *Salmonella*. New York: Nova Publishers. p. 175-191, 2015.

WADAMORI Y.; GOONERATNE R.; HUSSAIN M. A. Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce. **J Sci Food Agric**, v. 97, p. 1396–1403, 2017.

WHEELER, T. L.; KALCHAYANAND, N.; BOSILEVAC, J.M. Pre-and post-harvest interventions to reduce pathogen contamination in the US beef industry. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 372–382, 2014.

WHITING, R. C. Microbial modelling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 467-494, 1995.

WIEDEMANN, S. G.; MCGAHAN, E. J.; MURPHY, C. M. Resource use and environmental impacts from Australian chicken meat production. **Journal of Cleaner Production**, v. 140, p. 675-684, 2017.

WHO. 2015. Food safety Fact sheet N°399. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>. Acesso em 03 de novembro de 2019.

WHO, FAO. Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. **Geneva: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data editors**, 2002.

ZWIETERING, M. H. et al. Modeling of the bacterial growth curve. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.