

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Rafaela Busnello

**SOBREVIVÊNCIA DE *Salmonella* spp. EM PÉS SUÍNOS SUBMETIDOS AO  
PROCESSO DE SALGA SECA**

Porto Alegre  
2023



Rafaela Busnello

**SOBREVIVÊNCIA DE *Salmonella* spp. EM PÉS SUÍNOS SUBMETIDOS AO  
PROCESSO DE SALGA SECA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Porto Alegre

2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Busnello, Rafaela  
SOBREVIVÊNCIA DE Salmonella spp. EM PÉS SUÍNOS  
SUBMETIDOS AO PROCESSO DE SALGA SECA / Rafaela  
Busnello. -- 2023.  
68 f.  
Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Salmonella. 2. Redução de salmonella . 3.  
Controle de qualidade. 4. Abate de suíno. 5.  
Salmonella em pés suínos. 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).



“Eu não escolhi o caminho mais fácil, mas vencer desafios sempre foi  
minha maior motivação”.

Autor: Desconhecido

## **AGRADECIMENTOS**

A Minha filha Cecília Busnello Vezaro, você é a minha maior inspiração, motivação e motivo de felicidade.

Meus pais Mario A. Busnello e Lucy M. Busnello pelos ensinamentos, pelo exemplo de garra e coragem, com vocês eu aprendi o quanto deveria ser forte e lutar pelo meu próprio bem. Sou eternamente grata a Deus pela vida e pela oportunidade de ser filha de vocês!

Ao meu marido Marcos Vezaro pelo incentivo e por ter feito o papel de pai e de mãe todas as vezes que estive ausente. A minha sogra, Marília Vezaro por ter sido minha maior rede de apoio com a Cecília durante todo esse tempo.

As minhas gestoras Katia C. de Paula e Christiane T. Huller por terem me permitido conciliar trabalho e estudo.

Luisa Aneiros Gené e Mariana Ferreira Silva, pela oportunidade de ter trabalhado com esse tema de tamanha relevância para a nossa empresa e por todo o apoio e discussões durante todo experimento.

A minha colega de trabalho Paola Fonseca Tonin, por toda dedicação e empenho na execução de todos os testes, obrigada por ter colocado a “mão na massa” junto comigo e por ter sido meu braço direito e esquerdo ao longo de todas as análises.

Ao meu orientador Eduardo Cesar Tondo, por ter aceitado o desafio de orientar alguém com o meu perfil, fora do mundo acadêmico e como uma vida pessoal e profissional bastante tumultuada. Você foi fundamental para não me deixar desistir todas as vezes que pensei nessa possibilidade.

# **SOBREVIVÊNCIA DE *Salmonella* spp. EM PÉS SUÍNOS SUBMETIDOS AO PROCESSO DE SALGA SECA<sup>1</sup>**

Autor: Rafaela Busnello

Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

## **RESUMO**

O Brasil é o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína e, apesar dos grandes esforços das indústrias para prevenir a contaminação microbiológica, *Salmonella* spp. ainda podem ser encontrada nesses produtos. Dentro das indústrias, lotes contaminados são submetidos a tratamentos térmicos para eliminar *Salmonella*. Contudo, produtos suínos com menor valor agregado, como os pés suínos, são descartados, uma vez que o seu processamento térmico não é financeiramente vantajoso. A identificação de um processo barato capaz de eliminar *Salmonella* desses produtos pode ser uma alternativa para evitar tal descarte. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sobrevivência de *Salmonella* spp. em pés suínos submetidos ao processo de salga seca. Pés suínos foram artificialmente contaminados com três níveis de inóculos de *Salmonella* spp., baixo ( $1 \times 10^2$  UFC/g), médio ( $1 \times 10^5$  UFC/g) e alto ( $1 \times 10^8$  UFC/g). Posteriormente passaram pelo processo de salga e, em seguida, foram acomodados em refrigeradores com temperatura de 8-10°C, por 30 dias. A sobrevivência de *Salmonella* spp. foi avaliada até o dia 18, quando os pés suínos foram inoculados com o inóculo baixo e até o dia 30, quando as amostras foram contaminadas com os inóculos médio e alto. A quantidade do microrganismo foi avaliada através de contagem direta em ágar Desoxicolato Lisina Xilose (XLD) e Ágar Manitol Lisina Cristal Violeta Verde Brilhante (MLCB) e a detecção de *Salmonella* spp. foi realizada pelo método qualitativo LAMP MDS™ (3M). Análises de atividade de água e pH foram realizadas em cada dia de amostragem. Em paralelo a esses experimentos, a quantificação de *Salmonella* spp. foi realizada em amostras de pés suínos naturalmente contaminadas durante o processo, a fim de identificar os níveis de contaminação reais desses produtos. Os resultados demonstraram que foram necessários 18 dias para a eliminação completa de *Salmonella* nas amostras contaminadas com inóculo baixo. Já para as amostras com inóculos médio e alto foram necessários 26 dias para *Salmonella* spp. não ser mais encontrada em placas, porém resultados positivos no método qualitativo permaneceram até 30 dias. Considerando que a contaminação de *Salmonella* spp., encontrada nos pés suínos, foi de máximo  $1,57 \log_{10}$  UFC/g, o processo de salga seca pode ser uma alternativa de processo adicional para a redução significativa ou até eliminação de *Salmonella* spp. em pés suínos contaminados por esse microrganismo.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (40 p.) julho, 2023.

# **SURVIVAL OF *Salmonella* spp. DURING DRY SALTING PROCESS OF SWINE FEET<sup>1</sup>**

Author: Rafaela Busnello

Advisor: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

## **ABSTRACT**

Brazil is the fourth largest producer and exporter of pork in the world and, despite the great efforts of industries to prevent microbiological contamination, *Salmonella* spp. can still be found in these products. Within industries, contaminated lots are subjected to heat treatments to eliminate *Salmonella*. However, pork products with lower added value, such as pig feet, are discarded, since their thermal processing is not financially advantageous. The identification of an inexpensive process capable of eliminating *Salmonella* from these products can be an alternative to avoid such disposal. The objective of this work was to evaluate the survival of *Salmonella* spp. in swine feet submitted to the dry salting process. Pig feet were artificially contaminated with three levels of *Salmonella* spp. inoculum, low ( $1 \times 10^2$  CFU/g), medium ( $1 \times 10^5$  CFU/g) and high ( $1 \times 10^8$  CFU/g), subsequently passed through the salting process and then were accommodated in refrigerators with a temperature of 8-10°C, for 30 days. The survival of *Salmonella* spp. was evaluated until day 18, when the swine feet were inoculated with the low inoculum, and until day 30, when the samples were contaminated with the medium and high inoculum. The quantity of the microorganism was evaluated through direct counting on Deoxycholate Lysine Xylose agar (XLD) and Brilliant Green Violet Crystal Mannitol Lysine Agar (MLCB) and the detection of *Salmonella* spp. was performed using the qualitative method LAMP MDSTM (3M). Water activity and pH analyzes were performed on each sampling day. In parallel to these experiments, the quantification of *Salmonella* spp. was carried out on swine feet samples naturally contaminated during the process, in order to identify the actual contamination levels of these products. The results demonstrated that it took 18 days for complete elimination of *Salmonella* in the low inoculum contaminated samples. For samples with medium and high inoculum, 26 days were necessary for *Salmonella* spp. no longer found in plaques, but positive results in the qualitative method remained for up to 30 days. Considering that the contamination of *Salmonella* spp., found in swine feet, was a maximum of  $1.57 \log_{10}$  CFU/g, the dry salting process can be an additional process alternative for the significant reduction or even elimination of *Salmonella* spp. in swine feet contaminated by this microorganism.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (40 p.) July, 2023.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	3
2.1	Objetivo Geral .....	3
2.2	Objetivos Específicos.....	3
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
3.1	Carne Suína.....	4
3.2	Produção de carne suína .....	5
3.3	Biossegurança da suinocultura .....	8
3.4	<i>Salmonella</i> spp. ....	10
3.5	Estresse microbiano.....	13
3.6	Processo de Salga.....	14
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
4.1	Local e amostras utilizadas .....	17
4.2	Cepas de <i>Salmonella</i> e preparo do inóculo .....	17
4.3	Inoculação do pool de <i>Salmonella</i> spp. nos pés suínos.....	18
4.4	Processo de salga seca .....	19
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	26
5.1	Resultados microbiológicos dos três experimentos .....	26
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	36
	<b>APÊNDICE</b> .....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Sobrevivência de Salmonella spp. em pés suínos submetidos à salga seca, por 18 dias, para inóculo baixo, e 30 dias, para inóculo médio e alto.....	26
<b>Tabela 2</b> - Resultados dos parâmetros Físico-Químicos em pés suínos submetidos à salga seca, por 30 dias.....	30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema demonstrativo das etapas do processo de abate de suínos, separadas entre as zonas sujas e zonas limpas .....	7
<b>Figura 2</b> - (A e B). <b>A</b> – Diluição do pool de Salmonella spp. No tubo de ensaio utilizando corante comestível azul para facilitar a verificação visual do espalhamento, e inoculação sobre os pés suínos. <b>B</b> – Pés suínos inoculados alternando entre parte interna e externa da peça, aguardando o tempo de secagem do inóculo sobre a superfície, para posterior início do processo de salga .....	18
<b>Figura 3</b> - (A e B). <b>A</b> – Pés dispostos dentro do saco de plástico com a adição do sal para processo de salga. <b>B</b> - Processo de salga sendo realizado manualmente, através de massagem e homogeneização manual por 8 a 10 minutos .....	19
<b>Figura 4</b> - Preparo das amostras de pés suínos para ensaio microbiológico em capela de fluxo laminar, com pesagem de 25g de amostra e diluição 1:10 com água peptonada tamponada no equipamento Dilumat® e posterior homogeneização em Stomacher® para plaqueamento .....	21
<b>Figura 5</b> - (A e B). <b>A</b> – Placa de XLD com novo isolamento de Salmonella spp., realizado por estriamento utilizando alça descartável de 1uL. <b>B</b> – Placa de MLCB, com crescimento característico de Salmonella spp., após novo isolamento realizado da mesma forma .....	23
<b>Figura 6</b> - Galeria miniaturizada Bactray. A galeria superior foi inoculada com colônia isolada em meio XLD e a galeria inferior com colônia isolada em meio MLCB, ambas com provas bioquímicas características para Salmonella spp .....	23
<b>Figura 7</b> - Demonstração do desempenho dos métodos XLD e MLCB ao longo dos dias do processo de salga no inóculo baixo, os resultados estão apresentados em $\log_{10}$ UFC/g .....	28
<b>Figura 8</b> - Demonstração do desempenho dos métodos XLD e MLCB ao longo dos dias do processo de salga no inóculo médio, os resultados estão demonstrados em $\log_{10}$ UFC/g .....	29
<b>Figura 9</b> - Demonstração do desempenho dos métodos XLD e MLCB ao longo dos dias do processo de salga no inóculo alto, os resultados estão apresentados em $\log_{10}$ UFC/g .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Amostra branco
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AW	Atividade da água
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CI	Controle do inóculo
CS	Controle de salga
DTHA	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MLCB	Lisina Cristal Violeta Verde Brilhante
MS	Ministério da Saúde
SIF	Serviço de inspeção federal
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
TSA	Triptona de Soja
XLD	Desoxicolato Lisina Xilose



## 1. INTRODUÇÃO

A carne suína foi a segunda proteína animal mais consumida no mundo (EMBRAPA, 2022), projetando o Brasil para a importante posição de quarto maior produtor e exportador de carne suína do planeta. Além das exportações, a carne suína também é amplamente consumida no Brasil, um país com mais de 214 milhões de habitantes, onde foram produzidas 4,350 milhões de toneladas desse alimento, das quais 30,32% foram exportadas (USDA, 2016).

Para garantir a segurança e a qualidade necessárias às demandas nacionais e internacionais, as indústrias de carne suína e o governo brasileiro têm empregado grandes esforços para melhorar seus processos e qualificar seus funcionários. Por meio da valorização e do estímulo a parcerias entre indústrias de alimentos e instituições de pesquisa e universidades, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem promovido o desenvolvimento de tecnologias de produção inovadoras (MAPA, 2022), bem como modernizando suas legislações embasados em conhecimento científico (EMBRAPA, 2015; EMBRAPA, 2019).

Apesar de todos esses esforços, alguns lotes de carne suína ainda apresentam *Salmonella* spp., um dos mais importantes patógenos em nível mundial. Esse microrganismo é comumente encontrado no trato intestinal de suínos e outros animais, o que possibilita sua entrada na cadeia produtiva durante a criação, transporte, espera nas baias, abate e processamento de suínos. Nas indústrias, lotes de carne suína contaminados com *Salmonella* spp. são destinados à fabricação de produtos submetidos ao processamento térmico, possibilitando a inativação do microrganismo. Contudo, produtos com menor valor agregado, como os pertences suínos (pés, orelha, fuço, rabo e retalho da costela), são descartados quando contaminados com *Salmonella* spp., uma vez que o seu processamento térmico não é financeiramente viável. A produção e comercialização de pertences suínos é uma opção de baixo custo em relação aos cortes nobres e, por isso, torna-se atrativa, atendendo à necessidade de uma boa parcela da população brasileira. Além disso, esses produtos são utilizados em um dos mais famosos pratos brasileiros, a feijoada, consumida em todo o território nacional e em diversos outros países. Os pés suínos salgados estão entre os pertences suínos mais procurados e são também alimentos de interesse de alguns mercados internacionais, o que aumenta a sua importância.

Uma vez que o valor e o custo de produção de pés suínos são inferiores aos dos cortes nobres, muitas vezes, quando estes produtos apresentam *Salmonella* spp., eles são descartados. Isto ocorre porque tais produtos não podem ser comercializados com o

patógeno e o seu reprocesso torna-se inviável financeiramente. Como alternativa, os pés suínos podem ser submetidos a salga seca, um processo composto por duas etapas: 1: Salga – necessária para a penetração do sal no produto e solubilização do mesmo na água existente na carne; 2: Pós-salga – tempo necessário para a difusão do sal e distribuição através da peça. A perda de água do tecido que ocorre nas primeiras duas horas de salga seca é maior que a da salga úmida. A salga diminui a atividade de água ( $a_w$ ) dos pertences suínos, inibindo a multiplicação microbiana e contribuindo com a qualidade microbiológica. Ainda que esse processo possa contribuir com a conservação dos pés suínos, não é claro o efeito da salga seca na inativação de *Salmonella* spp. Em busca na literatura, não foram encontrados trabalhos científicos recentes, para a avaliação específica de *Salmonella* spp. em pés suínos. O presente estudo tem como objetivo avaliar a inativação em pés suínos submetidos ao processo de salga seca.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a sobrevivência de *Salmonella* spp. em pés suínos submetidos ao processo de salga seca.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar o tempo necessário para inativar *Salmonella*, artificialmente inoculada em três níveis de contaminações, em pés suínos submetidos ao processo de salga

2.2.2 Identificar os níveis reais de contaminação de pés suínos naturalmente contaminados durante o seu processamento;

2.2.3 Propor um processo alternativo ao processo térmico utilizado industrialmente;

2.2.4 Avaliar o comportamento do microrganismo em relação a  $a_w$ , pH e ao teor de sal.

2.2.5 Avaliar o desempenho do ágar XLD e do ágar MLCB para contagem direta de *Salmonella* spp.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Carne Suína

A produção de suíno é extremamente versátil, uma vez que este animal tem 100% de aproveitamento pela indústria. Além da carne, outras partes do suíno são utilizadas como matéria-prima para a produção de subprodutos ou então utilizadas para extração de outros derivados, como o caso da gelatina, extraída do colágeno da pele do animal que, por sua vez, é utilizado em vários outros produtos, inclusive em cosméticos.

De acordo com os dados apresentados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2016), no ano de 2022, a carne suína foi a segunda proteína animal mais consumida no mundo. Essa proteína vem ganhando espaço no mercado brasileiro e mundial (EMBRAPA, 2022).

Conforme a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2022), o Brasil está entre os maiores produtores de carne suína, ficando atrás apenas da China, União Europeia e dos Estados Unidos. O Brasil tem demonstrado crescimento significativo nesse mercado nos últimos anos. Em 2022, produziu cinco milhões de toneladas, o que representou um aumento de 7% em relação a 2021. Nesse mesmo ano, esteve também na quarta posição dentre os países que mais exportam carne suína no mundo, comercializando para outros países 1,1 milhão de toneladas.

Os principais produtos de origem suína exportados pelo Brasil são, em primeiro lugar, a carcaça e em segundo os pedaços que compõe o grupo de cortes. Essas são as partes que representam a maioria do animal, sendo pedaços de carnes nobres como, por exemplo, a barriga, lombo, paleta e costela. Em seguida, como terceiro na lista de exportações, estão os miúdos suínos. Já as demais partes do animal, como os retalhos, couro, gordura e industrializados (carnes que passam por processo de elaboração, normalmente com adição de outros ingredientes, ex. salsicha, presunto, bacon, linguiça) são na maioria consumidos pelo mercado interno (ABPA, 2022).

Assim como as demais partes do animal, o grupo dos pertences ou miúdos suínos, composto pelas extremidades do animal como fuço, máscara, patas traseiras e dianteiras, orelhas, rabo e retalho de costela, são igualmente reconhecidos como proteína animal. Esses produtos são originados de uma produção relativamente barata o que os tornam mais acessíveis aos consumidores finais. Devido ao custo baixo e por serem culturalmente utilizados no preparo de alguns pratos típicos, como a feijoada, eles são bastante consumidos pela população brasileira e de outros países.

Para esta posição, é importante manter a qualidade e inocuidade desses produtos. A salmonelose é uma doença humana bem conhecida e está associada à ingestão de alimentos contaminados, incluindo produtos suínos. Embora os abatedouros frigoríficos implementem rigorosos procedimentos sanitários durante o processamento de carcaças, alguns produtos de carne suína ainda apresentam contaminação por *Salmonella* spp (EFSA; ECDC, 2022).

Essa é uma realidade presente no mundo todo. Podemos ver, por exemplo, os dados das coletas oficiais realizadas em cumprimento aos critérios de higiene de processo nos matadouros da União Europeia em 2021. Das 24.802 amostras de carcaças coletadas nos matadouros da federação, após o preparo e antes do resfriamento, 1,7% apresentaram resultado positivo para *Salmonella* spp. (EFSA; ECDC, 2022).

### 3.2 Produção de carne suína

A suinocultura possui uma cadeia produtiva bastante complexa e que envolve vários outros setores e produtos como a produção de grãos, as fábricas de ração animal, o produtor dos animais, setor de transporte, os abatedouros frigoríficos e, por fim, todo o transporte e disposição ao consumidor final. A qualidade da carne suína que chega à mesa do consumidor é garantida por esforços originários de todos os pontos da cadeia produtiva.

A cadeia produtiva da suinocultura já possui elevado nível de tecnologia em seu processamento o que garante mais credibilidade de seus produtos. Entretanto, problemas devido à grande produtividade precisam ser avaliados tendo como perspectivas exigências que o mercado necessita. A contaminação de suínos por *Salmonella* pode ser influenciada por diversas variáveis como, a presença de sorovares patogênicos nos suínos, que podem resultar em gastroenterites e septicemias nos animais. A presença de sorovares não patogênicos aos suínos, mas sim aos humanos, tornando-os portadores assintomáticos. No abatedouro o principal objetivo deve ser as ações tomadas para evitar a contaminação cruzada, como a eficácia do chamuscamento e a melhora das boas práticas de fabricação na manipulação (Alban; Stark, 2005).

O transporte dos suínos e a mescla de lotes na chegada aos abatedouros frigoríficos são etapas de grande importância para a ocorrência da excreção de *Salmonella* por animais portadores, tornando as baias de espera, onde os suínos são mantidos de duas a oito horas, antes do abate, uma importante fonte de infecção (SWANENBURG et al., 2001). Os suínos em contato com o ambiente contaminado e com animais portadores podem ser infectados em poucas horas, passando a carrear *Salmonella* em seu trato

gastrintestinal ou em outras partes, no momento do abate (HURD et al., 2001). Esses animais, por sua vez, são importantes fontes de contaminação para os produtos finais, pois estima-se que a maioria das carcaças contaminadas por *Salmonella* tenham sido previamente contaminadas por animais portadores do microrganismo (BERENDS et al., 1998; BOTTELDOORN et al., 2003).

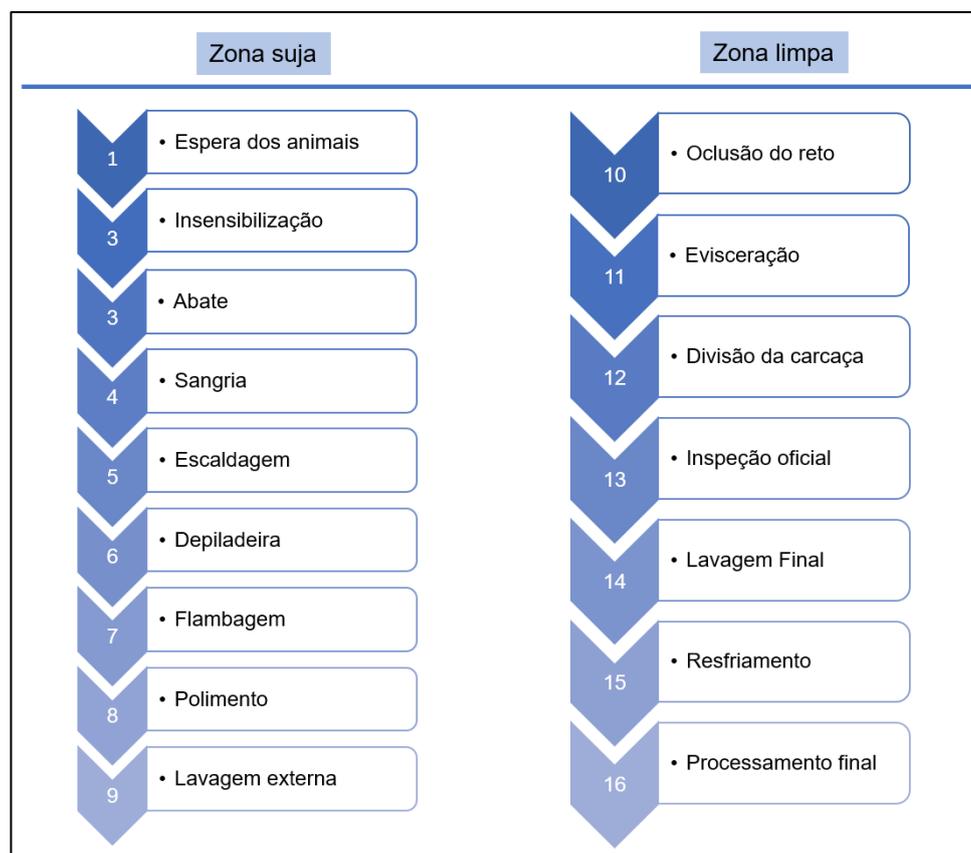
Os pés suínos podem ser contaminados por *Salmonella* horas antes do abate, muito provavelmente devido as fezes dos animais presentes nas baias de transporte.

O processo de abate de suínos acontece em duas zonas, a zona suja e limpa. A zona suja inicia com a espera dos animais, passando pelo processo de insensibilização. Após o abate, ocorre a sangria, que é a fase em que o animal é pendurado em trilhos, a fim de eliminar todo o sangue do corpo, são eliminados em média três litros por animal. Em seguida, ocorre a escaldagem, processo caracterizado pela imersão da carcaça do animal em um tanque com água em temperatura de aproximadamente 65°C. Com duração de dois a cinco minutos, a etapa de escaldagem é responsável pelo relaxamento de toda musculatura do animal, sendo essa fase importante para auxiliar na remoção dos pelos, unhas, cascos e retirada de sujidades. Depois, as carcaças são direcionadas a um equipamento conhecido como depiladeira, responsável pela depilação da peça. Esses passos são muito importantes, uma vez que a musculatura da carcaça está relaxada, como resultado da escaldagem, e, nas depiladeiras, pode ocorrer o extravasamento de fezes, causando contaminação nas carcaças. Na etapa seguinte de flambagem, a carcaça passa por chamuscadores que queimam qualquer resquício de pelos que possa ter ficado aderido a pele, seguindo para o polimento e, por fim, uma nova lavagem, antes de entrar na zona limpa (KICH; SOUZA, 2015; CÊ, 2016).

A zona limpa inicia com a oclusão do reto realizado para que o conteúdo fecal não seja extravasado. Em seguida, a carcaça passa para a etapa de evisceração que consiste na retirada das vísceras do animal, onde uma abertura é realizada, do pescoço até a região inguinal da carcaça. Posteriormente, as vísceras são removidas. Esse processo pode ser realizado manualmente ou através de maquinário específico para essa atividade. Na próxima etapa, ocorre a inspeção oficial que pode ser estadual ou federal. Posteriormente, as carcaças são novamente lavadas e seguem para resfriamento, onde aguardam até a embalagem, desossa ou realização de cortes (KICH; SOUZA, 2015; CÊ, 2016).

A Figura 1 apresenta as etapas do processo descrito.

**Figura 1** - Esquema demonstrativo das etapas do processo de abate de suínos, separadas entre as zonas sujas e zonas limpas



Fonte: O autor (2022).

Alguns autores demonstram que a contagem microbiana aumenta significativamente após a etapa de evisceração, sendo ela o ponto mais importante de contaminação no abate suíno, uma vez que os microrganismos facilmente se distribuem sobre toda a superfície da carcaça (MOURA-ALVES et al., 2022; PERUZY et al., 2022).

Moura-Alves et al. (2022) realizaram análises de dois abatedouros frigoríficos no Norte de Portugal, onde foram coletadas 16 amostras de suabes em ralos e 259 amostras de carcaças, após o processo de evisceração. Também foram incluídas a coleta de 37 fígados oriundos das mesmas carcaças. Foram identificados 52 isolados de *Salmonella* spp., sendo 44 em carcaças, cinco em fígados e três em ralos. O pescoço e a região abdominal foram as superfícies mais contaminadas com o microrganismo. Nessas áreas também foram encontradas as maiores contagens de bactérias mesófilas, Enterobacteriaceae e *E. coli*, microrganismos comumente utilizados como indicadores de higiene e que têm sido relacionados à presença de *Salmonella* spp.

Peruzy et al. (2022) analisaram oito carcaças suínas abatidas em dois

abatedouros frigoríficos na região da Campânia, sul da Itália. As carcaças analisadas após processo de evisceração, foram amostradas em quatro partes diferentes, pernil, dorso, papada e barriga com coletas de suabe, sobre área de 100 cm<sup>2</sup>. Os resultados demonstraram que sete carcaças apresentaram positividade para *Salmonella*, sendo quatro pernis, quatro dorsos, sete papadas e três barrigas.

### 3.3 Biossegurança da suinocultura

Prevenir a contaminação por *Salmonella* spp. em toda a cadeia produtiva do suíno é determinada principalmente pela limitação do acesso dos animais as fontes de infecção. É comum o animal apenas carregar o microrganismo no organismo sem expressar sintomatologia, visto que muitos serovares não o causam patologias, esse é um grande perigo, uma vez que poderá ocorrer a contaminação silenciosa de todo o rebanho (KICH; SOUZA, 2015).

A legislação cada vez mais rigorosa, juntamente com o aumento da consciência pública, têm levado as indústrias de alimentos e os órgãos legislativos a testar intensivamente os produtos alimentícios de origem animal para garantir a segurança dos alimentos. *Salmonella* spp. é um dos patógenos mais importantes encontrados em produtos alimentícios de origem animal (CHIN et al., 2017).

O suíno, uma vez contaminado, pode permanecer apenas como portador mantendo o microrganismo principalmente no intestino e nos linfonodos mesentéricos, sem apresentar sintomatologia. Como resultado de estresse do transporte e do pré-abate, é comum que eliminem o microrganismo nas fezes. Assim que elimina as fezes infectadas, pode ocorrer uma disseminação e conseqüente recontaminação dos outros animais (KICH; SOUZA, 2015). Na avaliação de três abatedouros, com inspeção federal, no Estado de Santa Catarina, a presença de *Salmonella enterica* nas pocilgas de espera para o abate pode ser verificado em mais de 80% das amostras analisadas no teste (PISSETTI et al., 2012).

A contaminação de carcaça suína é originada principalmente de animais vivos portadores, que carregam o microrganismo até o fim do processo produtivo. Normalmente os índices de positividade variam ao longo do processo, mas por vezes as carcaças chegam ao final, na etapa de resfriamento, ainda positivas. A relação genética entre as cepas *Salmonella* Typhimurium variante monofásica (1,4[5],12:i:-), encontradas nas baias de espera e as encontradas na carcaça resfriada, indicam que a contaminação foi capaz de acompanhar o animal desde o início da cadeia (MARIN et al., 2020).

O processo de abate também pode constituir fonte de contaminação cruzada, principalmente quando não são mantidas condições adequadas de higiene. Ao longo da linha de abate, pode ocorrer o extravasamento do conteúdo do intestino ou rompimento dos nódulos linfáticos, espalhando material para todo o processo produtivo, tornando a contaminação da carne um resultado de eventos de contaminação cruzada e/ou recontaminação durante qualquer etapa da produção: abate, processamento, transporte e armazenamento da carne (CASTELIJN et al., 2013). Ainda a *Salmonella* spp. presente no conteúdo intestinal dos animais pode ser facilmente transferida para a pele das carcaças, levando à contaminação para o produto cárneo final (EFSA; ECDC, 2022).

O processo de depilação é uma das etapas industriais mais relacionados a contaminação, essa etapa por vezes, apresenta maior nível de presença de *Salmonella* spp., em relação as demais etapas normalmente avaliadas. Essa condição pode se dar por dois pontos principais, pelo extravasamento do conteúdo fecal, visto que nessa etapa, o reto ainda está aberto ou então pelo fluxo baixo de água e temperatura, aumentando a multiplicação bacteriana dentro da máquina de depilação (CÊ, 2016).

Todos esses eventos devem ser tratados de forma séria e robusta através de diversas ferramentas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) aplicadas ao processo e que garantam o controle sobre a disseminação desse e outros microrganismos patogênicos.

A implantação de Sistemas de gestão robustos dentro dos processos de abate e industrialização de carnes torna-se fundamental para garantir a segurança dos alimentos. A principal ação preventiva desses sistemas são os programas de APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). Esses visam o controle biológico, químico e físico desde a produção, aquisição e manuseio de matérias-primas, a fabricação dos produtos, a distribuição e consumo do alimento acabado. A análise de microrganismos indicadores e de microrganismos patogênicos sempre deve ser considerada parte de um sistema integral de segurança dos alimentos (EFSA; ECDC, 2022).

Os critérios utilizados para a implantação desses sistemas podem ser muito variados e na maioria das vezes levam em consideração a legislação vigente do Brasil e dos países aos quais se exporta ou pretende fazer exportação.

Como referência internacional, uma das legislações mais representativas é a Diretiva da Comunidade Europeia CE - 2073/2005 consolidada, considerando que esse é um mercado muito visado pelos produtores de carne do mundo inteiro. Já no Brasil temos duas formas de atendimento a legislação, a Instrução normativa IN 60/2018 determinada pelo MAPA e aplicada especificamente para processamento de suínos no abatedouro. A

outra legislação, é definida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2022) através da Resolução RDC 724/2022 e seu anexo IN 161/2022 que estabelece os padrões para diferentes categorias de alimentos.

Essas legislações definem parâmetros microbiológicos, considerados como critérios de higiene de processo, cujo objetivo é avaliar as condições higiênico-sanitárias na produção dos alimentos, dentre os quais estão contemplados os microrganismos de interesse em saúde pública, como a *Salmonella*. A conformidade com os critérios deve ser verificada pela própria empresa como parte dos seus Programas de Autocontrole, como exemplo o programa de APPCC. Além disso, a autoridade competente, deve garantir que a empresa cumpra com esses requisitos regulatórios.

### 3.4 *Salmonella* spp.

Na União Europeia, onde existe um maior controle sobre os dados de surtos alimentares, a salmonelose foi a segunda maior causadora de infecções gastrintestinais de origem alimentar, ficando atrás apenas da campilobacteriose (EFSA; ECDC, 2022).

Os dados apresentados pelo Relatório de Zoonoses “*One Health*” da União Europeia, mostraram que no ano de 2021, 60.050 casos de salmonelose humana foram registrados e confirmados, o que representou uma taxa de notificação de 15,7 por 100.000 habitantes, representando um aumento de 14,3% em comparação com os valores de 2020. Nas faixas etárias mais acometidas, estão as crianças de 0 a 4 anos (27,7%), 5 a 9 anos (13,8%) e os idosos acima de 65 anos (16,5%) (EFSA; ECDC, 2022).

Ainda avaliando esses dados da união Europeia, o número total de casos confirmados em 2021 foi maior que os de 2020, que teve 52.690 confirmações, mas é menor do que os anos anteriores onde 2019 (87.908), 2018 (92.858) e 2017 (91.587). Essa diminuição de casos, em 2021, em relação aos demais anos, muito provavelmente está relacionado a pandemia do COVID-19 e ao tempo de *lockdown* ao qual as pessoas foram submetidas a cumprir (EFSA; ECDC, 2022).

Seguindo a avaliação dos dados emitidos por esse mesmo relatório, no âmbito da avaliação dos diferentes grupos de alimentos, em 2021, para cumprimento do regulamento 2073/2005, foram testadas 32.212 amostras de diferentes matrizes alimentares. Essas amostras foram coletadas durante as etapas de fabricação sendo que 904 amostras apresentaram resultado positivo para *Salmonella*. Dentre esses dados o CMS (carne mecanicamente separada) esteve como a principal matriz a apresentar positividade, representando 13,3%. Já a carne suína, classificada dentro da matriz “*Carne picada e*

*preparados de carne de outras espécies que não aves de capoeira destinados a serem consumidas cozidas*", representou apenas 1,1% ou 41 amostras positivas (EFSA; ECDC, 2022).

Já nos dados colhidos pelos Estados Unidos, em 2021 foram investigados 135 possíveis surtos, sendo que 74 foram confirmados como surtos entéricos atingindo 3615 pessoas e resultando em 26 mortes. Esse valor é maior do que os encontrados em 2020 mas inferiores aos encontrados em 2019, essa variação está ligada em partes, aos efeitos da contínuos da pandemia de COVID-19. *Salmonella* spp. foi o principal causador desses surtos, seguido de STEC e *Listeria* sucessivamente. Do total de surtos confirmados, 51 foram causados por *Salmonella* e afetaram um total de 3320 pessoas (CDC, 2023).

*Salmonella* spp. é um microrganismo patogênico, que pode causar infecções graves ao ser humano e animais. O habitat natural dessa bactéria é o trato intestinal de animais de sangue quente, essa condição é o que torna difícil manter o seu controle para a indústria, tornando a sua erradicação uma tarefa praticamente impossível. Uma vez presente no trato intestinal, essa bactéria pode ser facilmente dispersada no ambiente de criação e produção através das fezes ou extravasamento do conteúdo intestinal do animal.

Essa é uma bactéria em forma de bastonete, gram-negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família Enterobacteriaceae. A maioria dos seus serovares possui flagelos distribuídos em sua superfície, garantindo que possuam motilidade, exceto os sorovares *S. Pullorum* e a *S. Gallinarum*, que são imóveis por não possuírem flagelos (RUSSEL, 2012).

Esse gênero, conta com mais de 2600 serovares registrados, divididos em apenas duas espécies, 1- *Salmonella bongori*, a qual é raramente encontrada em humanos, somente sendo isolada em animais de sangue frio e no ambiente. 2- *Salmonella enterica*, dividida em seis subespécies, onde estão os principais serovares causadores de infecção em humanos e animais como a *S. Thyphimurium*, *S. Enteritidis* e *S. monofásica*, classificados dentro da subespécie I (subespécie entérica) (MS, 2011).

Esse microrganismo se multiplica em temperatura entre 5 °C a 46°C, embora sua temperatura ideal de multiplicação seja 38°C. Não formam endósporos o que o torna suscetível a temperatura, sendo normalmente destruído a 60°C, por 15 a 20 minutos. O pH ideal para multiplicação encontra-se entre 3,7 e 9,5, sendo o pH ótimo entre 6,5 e 7,5. Esta bactéria possui uma  $a_w$  mínima ideal de 0.94 e é resistente por longos períodos de congelamento e desidratação desde que exista a presença de matéria orgânica (FORSYTHE, 2013).

A sintomatologia da doença alimentar causada por esse microrganismo inclui náuseas, diarreia, dor abdominal, febre e calafrios, podendo ainda apresentar dores de cabeça, vômito e fraqueza. Em alguns casos é possível um agravamento da doença, evoluindo para artrite reativa e Síndrome de Reiter que podem aparecer após três a quatro semanas depois do início dos sintomas agudos (FORSYTHE, 2013).

Nos dados divulgados pelo Ministério da Saúde (MS), o Brasil registrou e investigou 6.347 casos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), entre os anos de 2012 e 2021, sendo *Salmonella* spp. a terceira maior causadora desses surtos alimentares, o que representou 11,2% do total de surtos registrados nesse intervalo de tempo (MS, 2011).

Conforme os dados apresentados pela EFSA referentes a 2021, os cinco principais sorovares de *Salmonella* spp. envolvidos em infecções humanas, na União Europeia, foram: *S. Enteritidis* (54,6%), *S. Typhimurium* (11,4%), *S. monofásica* (1,4,[5],12:i:-) (8,8%), *S. Infantis* (2,0%) e *S. Derby* (0,93%).

*Salmonella* monofásica surgiu nos últimos 30 anos e tornou-se emergente como uma das principais causadora de salmonelose em humanos. Ela está entre os serovares mais resistentes da espécie e tem habitado principalmente alimentos de origem suína. Ela é conhecida como uma variação da *S. Typhimurium*, que carece de flagelina de segunda fase, ou dos antígenos 2H de fase 1,2, sendo caracterizada pela fórmula antigênica: (1,4,[5],12:i:-) (HARRISON et al., 2022).

Corbellini et al. (2016) avaliaram a prevalência de *Salmonella* e Enterobacteriaceae em abatedouros do sul do Brasil em dois experimentos. No teste “A”, 660 amostras de carcaça foram coletadas, sendo distribuídas igualmente em 11 etapas subsequentes do processamento de abate de suíno. Os resultados identificaram maiores números de positivities do microrganismo antes da escaldagem, sendo drasticamente reduzidos após a escaldagem, mas voltando a ter novo pico após a etapa de depilação e após a separação da carcaça.

De acordo com os estudos conduzidos por Lima et al. (2004), foi possível avaliar a presença de *Salmonella* spp. em quatro pontos monitorados para controle microbiológico no abate de suínos, sendo: ponto 1: imediatamente após a fase de escaldagem/depilação, ponto 2: antes da evisceração, ponto 3: após evisceração e divisão das carcaças e ponto 4: após 24 horas de refrigeração. Neste trabalho, Lima et al. (2004) constataram a existência de uma maior positividade no ponto 3, seguido do ponto 4, ponto 1 e ponto 2 respectivamente. Demonstrando que a evisceração é um ponto importante de atenção

devido ao possível extravasamento do conteúdo intestinal.

Os pertences suínos por possuírem um custo de produção bastante inferior aos cortes nobres, quando apresentam positividade para *Salmonella* spp. dentro da Indústria são, muitas vezes, descartados, pois não podem ser comercializados e o seu reprocesso torna-se inviável financeiramente, seja como matéria-prima ou por tratamento térmico, devido ao baixo custo de produção. Dessa forma, é importante desenvolver processos financeiramente viáveis e que eliminem *Salmonella* desses pertences, evitando o seu descarte.

### 3.5 Estresse microbiano

O estresse ou obstáculos microbianos são utilizados como controle na preservação dos alimentos no mundo inteiro, essa prática é baseada em criar barreiras de forma a inibir o crescimento, encurtar a sua sobrevivência ou causar a sua morte. São as respostas desses microrganismos a essas barreiras impostas que determinarão a possibilidade da sua sobrevivência (SMET et. al., 2015). O estresse pode ser definido como qualquer condição que afete diretamente o crescimento ou a sobrevivência de um microrganismo, sendo assim, muitos tratamentos industriais são considerados como estressores. Um estresse microbiano pode ser observado em três níveis diferentes que ocasionará resultados distintos no alimento processado. Estresse leve, causa ações subletais que não interrompem a sobrevivência do microrganismo, porém afetam o crescimento e multiplicação. Estresse moderado, ocorre a interrupção do crescimento microbiano e é capaz de causar perda de viabilidade celular. Estresse extremo, é o nível mais crítico e é letal para as células, resultando na morte celular da população do microrganismo (YOUSEF; JUNEJA, 2002).

Os microrganismos presentes nos alimentos podem ser indiretos ou diretamente influenciados por dois principais fatores de estresse: os intrínsecos que são aqueles dependentes de condições específicas presentes no alimento, como por exemplo, pH,  $a_w$  e potencial redox. Já os extrínsecos são caracterizados por atividades externas como a temperatura (SMET et. al., 2015).

Existem muitas formas de estresse (barreira) descritos no mundo todo, mas nesse trabalho foram utilizados dois estresses em conjunto, a refrigeração em temperatura de 8°C a 10°C e o processo de salga que conseqüentemente ocasiona outros dois estresses, a pressão osmótica e perda de água.

O processo de refrigeração pode ser utilizado para congelamento ou apenas

conservação, mas é um importante obstáculo pois é capaz de bloquear a atividade enzimática da bactéria, incapacitando a sua reprodução e consecutiva multiplicação. Já a pressão osmótica causada pelo sal em excesso, faz com que as células percam água, que por sua vez é primordial na regulação da pressão osmótica. A perda da água por osmose, leva a célula a plasmólise e/ou diminuição até rompimento da membrana citoplasmática até que a morte celular ocorra. Microrganismos sem capacidade de esporulação morrem mais facilmente nessa situação (SALVATIERRA, 2014).

Já a desidratação osmótica é um processo antigo baseado na eliminação parcial de água pela pressão ocasionada pelo agente adicionado (sal ou açúcar), conhecido como solução hipertônica de soluto. O contato entre essa solução e o produto ocasiona o fluxo de pressão osmótica através das paredes celulares diminuindo a quantidade de água e causando a morte da célula através da desidratação. Em combinação com outros fatores combinados, como por exemplo, pH, adição de aditivos, temperatura, entre outros (LOPES, 2007).

### 3.6 Processo de Salga

Conforme dados levantados por Neto et al. (2021), o processamento de carnes através do uso de sal é uma atividade antiga com primeiros registros antes de Cristo. Algumas teorias trazem a exposição de pedaços cárneos sob o sol em praias sofrendo a ação da maresia, outras a disposição da carne sobre as rochas no sol, onde absorviam os sais da rocha. Independentemente de como surgiu, essa é uma prática muito presente em grupos indígenas, o que certifica essa prática ser bastante antiga.

Ao longo do tempo, os processos antigos de salga passaram por algumas modificações, como por exemplo, a inclusão de novos ingredientes além do sal. Mesmo com algumas incrementações, a base desse processo segue sendo igualmente a dos tempos antigos. Iniciando pela desossa da carne, salga, ressalga, expor para secagem, necessário para induzir a perda de água auxiliando na sua conservação e por fim lavagem, nova secagem e embalagem. No Brasil, dois produtos são bastante conhecidos por utilizarem o processo de salga, o Charque originário no Sul do país e a Carne Seca do Nordeste, seus preparos são passados a décadas de geração a geração, comprovando a eficiência do processo de salga como conservante para alimentos cárneos (NETO et al., 2021).

A salga é um dos métodos mais tradicionais para a conservação dos alimentos, por ser um processo simples, de fácil elaboração, com baixo custo e bons resultados

através da desidratação osmótica causada pelo uso do sal (LOPES, 2007). Durante o processo de salga, verifica-se a penetração do sal e conseqüentemente a liberação de água da musculatura, diminuindo a atividade de água e criando condições impróprias para o desenvolvimento microbiano. Para garantir melhor conservação, ao final do processamento, o produto salgado é submetido a processos complementares, como secagem e/ou refrigeração (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998).

Taormina (2014) explica que durante o processo de salga a seco do presunto parma (3-4 semanas) a população de Enterobacteriaceae (família a qual pertence o gênero *Salmonella*, vai gradualmente diminuindo.

A salga úmida emprega os mesmos ingredientes que a salga seca, mas nesse caso, os mesmos são diluídos em água e o corte de carne permanece submerso nessa salmoura ou então pode ser injetado com ela. A salga úmida é mais exigente em cuidados que a salga seca, pois há necessidade de monitoramento cuidadoso do preparo da salmoura, além de maior rigor com os cuidados higiênicos. Durante todo o processo deve-se monitorar a salmoura para assegurar a sua densidade ou salinidade e essa deve ser corrigida sempre que necessário. Além disso, os tanques de salga devem ser esvaziados e limpos pelo menos uma vez por semana para prevenir a multiplicação de microrganismos halófilos (SHAHIDI; SAMARANAYAKA; PEGG, 2014).

Independente do processo de salga escolhido, seca ou úmida, ambos são processos lentos (TAORMINA, 2014). De acordo com Chabbouh et al. (2012), que estudaram a cinética da penetração de sal e a perda de água em produtos cárneos submetidos aos dois processos, a salga seca é equivalente à salga úmida (considerando uma salmoura de 26,5%) e mais eficaz se considerado salmouras menos concentradas. A salga seca ainda se sobressai quando avaliado a perda de água do tecido nas duas primeiras horas de processo. Também é capaz de induzir uma maior desidratação do produto quando comparada à salga úmida (teor elevado de NaCl, 26,5%). Após 24h a 48h de processo, a salga seca resulta em uma maior redução da população de bactérias mesófilas e de bolores e leveduras.

A salga é um processo utilizado no controle de microrganismos que conta basicamente com a diminuição da atividade da água no alimento submetido ao processo. Devido à alta concentração de sal, muitos deles não conseguem se multiplicar e/ou perdem viabilidade e conseqüentemente morrem devido a perda da água causada pela pressão osmótica (SALVATIERRA, 2014).

Em estudos realizados por Reynolds et al. (2001) com contaminação artificial de

*Salmonella* em presunto, a redução da população desse patógeno foi de 2,3 e 5,5 logs/g ao final da etapa de salga e ao final da etapa de maturação. Já a  $a_w$  final dos produtos avaliados, quando relatada, foi sempre superior a 0,90.

Arkoudelos, Samaras e Tassou (2003) verificaram resultados semelhantes, quando avaliaram a redução bacteriana de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis* em sardinhas salgadas durante a maturação de 115 dias, onde a população de *Salmonella* diminuiu linearmente até 60 dias de maturação.

O presente estudo tem o intuito de avaliar a sobrevivência de *Salmonella* em pertences suínos, quando submetidos à exposição ao sal iodado 0,06%, por 30 dias. A partir desses resultados, pretende-se entender se a salga seca pode ser uma opção economicamente viável para o processamento industrial de pertences suínos positivos para *Salmonella*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local e amostras utilizadas

Os experimentos foram realizados em um Laboratório de Microbiologia de uma empresa produtora de carne suína, no Município do norte do Rio Grande do Sul. O Laboratório possui acreditação pela ISO 17025:2017 em 32 ensaios microbiológicos e físico-químicos, e detêm estrutura física com capacidade para atendimento de 400 amostras/dia, através do trabalho de 35 colaboradores.

As amostras utilizadas nos testes do presente estudo foram pés suínos com tamanho médio de 25 cm e cortados ao meio, verticalmente. Elas foram fornecidas por um abatedouro frigorífico de suínos localizado em município do Oeste de Santa Catarina. A fábrica com capacidade de produção de 4800 suínos/dia e com mais 1000 mil colaboradores ativos, é habilitada para exportar para diversos países do mundo como aqueles da Ásia, Hong Kong, África do Sul.

### 4.2 Cepas de *Salmonella* e preparo do inóculo

Nesse estudo foram utilizados isolados de sete sorovares de *Salmonella* spp., sendo eles: *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Panama*, *S. Minnesota*, *S. Derby* e *Salmonella* monofásica (1,4,[5],12:i:-). Com exceção do isolado ATCC, todos os outros sorovares foram isolados de amostras de carne suína, as quais tiveram sua identificação confirmadas através do método Check & Trace *Salmonella* (Check-Point). A escolha dos sorovares foi realizada baseada no histórico de positivities em produtos suínos na empresa.

As culturas de cada isolado foram estocadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid, Altrincham, Inglaterra), com 30% de glicerol. Antes dos experimentos, uma colônia de cada isolado foi inoculada separadamente em Ágar Nutriente (Oxoid, Altrincham, Inglaterra) e incubadas a 36°C±1°C, por cerca de 18 horas, até atingirem fase estacionária de crescimento. Em seguida, uma suspensão de cada cultura foi preparada em 5mL de solução salina 0,85%, sendo posteriormente centrifugada e lavada com 10mL de solução salina 0,85%. Em seguida, 0,3mL de cada cultura foram adicionados em um tubo estéril, compondo um *pool* de *Salmonella*. A partir de então, o pool foi diluído em solução salina 0,85% até atingir aproximadamente 1x10<sup>8</sup> UFC/mL sendo essa concentração mensurada com o auxílio de um densitômetro Densimat (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França) com comprimento de onda de 950nm.

Uma gota do corante azul ARCOLOR® de grau alimentício foi adicionado ao

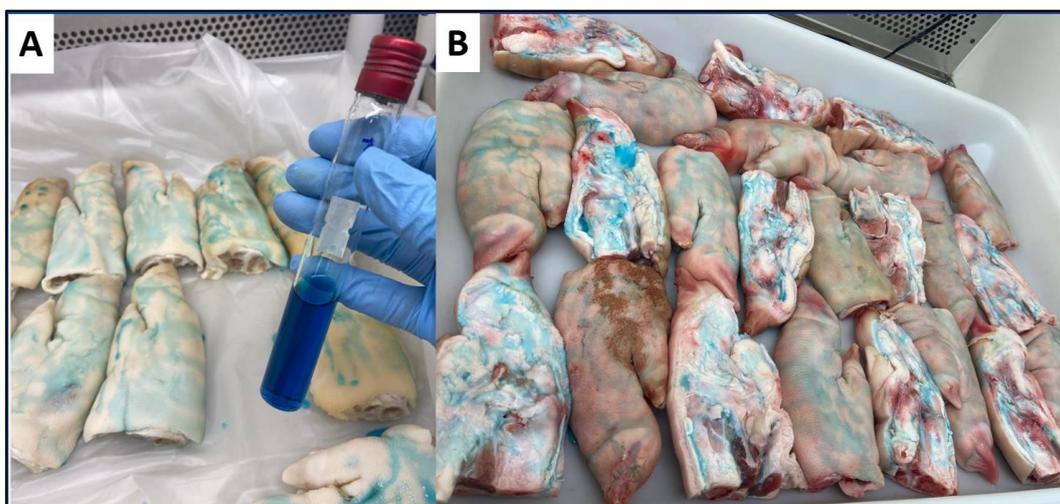
pool, a fim de monitorar o espalhamento homogêneo do inóculo sobre a superfície dos pés suínos.

#### 4.3 Inoculação do pool de *Salmonella* spp. nos pés suínos

Antes da inoculação artificial, lotes de pés suínos (cada um composto por aproximadamente 100 unidades de meio pé) foram analisados quanto a presença de *Salmonella* spp. pelo método MDS™, referência AFNOR 3M 01/16-11/16:2020. Foram realizadas análises em dez amostras aleatórias por lote e só foram inoculados os lotes cuja ausência de *Salmonella* spp. foi comprovada.

Para a inoculação, o pool de *Salmonella* spp. foi diluído em solução salina 0,85% e 1mL de diluições específicas foi dispensado separadamente sobre a superfície de cada pé suíno. As amostras foram artificialmente inoculadas com três níveis de inóculo de *Salmonella*, os quais foram denominados: baixo ( $1 \times 10^2$  UFC/g), médio ( $1 \times 10^5$  UFC/g) e alto ( $1 \times 10^8$  UFC/g). O inóculo dos pés suínos foi realizado tanto na face interna (parte da carne), quanto na face externa (parte do couro) de cada pé. Posteriormente à inoculação, as amostras foram mantidas em repouso por 20 a 30 minutos, em temperatura de  $9^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  até completa absorção do inóculo. A figura 2 (a e b) demonstram como foi realizada a inoculação dos pés suínos.

**Figura 2 - (A e B).** **A** – Diluição do pool de *Salmonella* spp. No tubo de ensaio utilizando corante comestível azul para facilitar a verificação visual do espalhamento, e inoculação sobre os pés suínos. **B** – Pés suínos inoculados alternando entre parte interna e externa da peça, aguardando o tempo de secagem do inóculo sobre a superfície, para posterior início do processo de salga



Fonte: O autor (2021).

#### 4.4 Processo de salga seca

As amostras contaminadas artificialmente e os controles negativos (pés não inoculados) foram pesadas e posteriormente acomodadas dentro de sacos plásticos estéreis. Em seguida, as amostras foram salgadas acrescentando sal seco iodado 0,06%, respeitando a proporção de 25% do peso total das amostras. Cada saco então foi fechado e a homogeneização realizada de forma manual, durante 8 - 10 minutos.

Os pés foram dispostos em bandejas vazadas para permitir a eliminação da água durante o processo de salga. As bandejas foram, então, acondicionadas em refrigerador com temperatura controlada de 8°C à 10°C. O sal remanescente do processo de salga foi colocado sobre os pés suínos criando uma camada de sal.

No quinto dia de salga, os pertences foram submetidos ao processo de ressalga, sendo novamente pesados e salgados com 25% de sal sobre o peso atual. Posteriormente, voltaram a ser armazenados como descrito acima. O tempo máximo de salga foi de 30 dias, pré-estabelecido por requisitos internos da empresa.

**Figura 3 - (A e B).** **A** – Pés dispostos dentro do saco de plástico com a adição do sal para processo de salga. **B** - Processo de salga sendo realizado manualmente, através de massagem e homogeneização manual por 8 a 10 minutos



Fonte: O autor (2021).

#### 4.5 Amostragem

Três amostras de pés suínos foram coletadas antes do início do processo, sendo consideradas as amostras Branco (AB), responsáveis por indicar as condições naturais dos pés suínos, sem a contaminação artificial de *Salmonella* spp. Imediatamente após a

inoculação do pool, foram realizadas as coletas de três amostras denominadas de controle do inóculo (CI). Após a salga, uma nova coleta de três amostras foi realizada e denominada de controle de salga (CS). Posteriormente a primeira hora de experimento e depois de 24 horas, três novas amostras foram coletadas e testadas e assim sucessivamente até o fim dos 30 dias, conforme demonstrado na Tabela 1.

Em todas as coletas, os ensaios foram realizados em triplicata para cada um dos dois métodos de semeadura em placas com meios seletivos diferenciais para *Salmonella* (XLD e MLCB), ou seja, para cada coleta, três amostras foram realizadas gerando 18 resultados.

A sobrevivência de *Salmonella* foi avaliada em três experimentos diferentes, sendo que o experimento 1 avaliou a sobrevivência do microrganismo a partir do inóculo baixo, o experimento 2 avaliou o inóculo médio, enquanto o experimento 3 avaliou a sobrevivência a partir do inóculo alto. Cada experimento foi repetido duas vezes e, em cada dia de coleta, foram coletadas três triplicatas de amostras, uma para cada nível de contaminação artificial ( $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^5$  e  $1 \times 10^8$  UFC/g).

No experimento 1, as amostras foram analisadas por 18 dias, pois a partir deste tempo, as contagens foram  $<10$  UFC/g e os testes qualitativos apresentaram resultados negativos (ausência em 25g). Os testes qualitativos foram conduzidos apenas para aquelas amostras que apresentaram resultados de contagem  $<100$  UFC/g. Para os experimentos 2 e 3 as amostras foram analisadas por 30 dias, conforme preconizado pela empresa.

## 4.6 Análises microbiológicas

### 4.6.1 Preparo inicial das amostras

Em cada dia de coleta, as amostras de pés suínos foram colocadas dentro de uma capela de fluxo laminar e 25g de cada pé suíno foram retiradas com o auxílio de uma faca e uma pinça estéril. Foram amostradas porções da face interna e externa dos pés suínos, as quais foram diluídas na proporção de 1:10, acrescentando 225 mL Água Peptonada Tamponada (APT, Merck, Darmstadt, Alemanha) as 25g coletadas. A pesagem e a diluição inicial foram realizadas em equipamento Dilumat® (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França) e a homogeneização em equipamento Stomacher® (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, França), já as diluições subsequentes foram feitas usando 9mL de Solução Salina Peptonada 0,85% com o auxílio de um Micropipetador automático (Merck, Darmstadt, Alemanha) e homogeneizadas em vórtex. Na Figura 4 é possível ver o preparo inicial das amostras, para análises microbiológicas, sendo realizado.

**Figura 4** - Preparo das amostras de pés suínos para ensaio microbiológico em capela de fluxo laminar, com pesagem de 25g de amostra e diluição 1:10 com água peptonada tamponada no equipamento Dilumat® e posterior homogeneização em Stomacher® para plaqueamento



Fonte: O autor (2021).

Posteriormente, as amostras foram submetidas a enumeração de *Salmonella* spp. através de semeadura direta, onde 1mL das diluições foram semeadas em placas 140x15mm de Ágar XLD (Oxoid, Altrincham, Inglaterra) e em paralelo em Ágar MLCB (Oxoid Altrincham, Inglaterra). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Binder, Tuttlingen, Alemanha) a  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 22 horas. A inoculação de 1mL em placas de tamanho maior (140x15mm), permitiu ao método utilizado um limite de quantificação de 10 UFC/g.

Após o tempo de incubação, as placas foram analisadas quanto à presença de colônias com crescimento característico, sendo considerado para o ágar XLD, colônias transparentes com ou sem centro negro e variações com coloração *pink* e centro *pink* escuro. Já no MLCB foram consideradas colônias típicas de *Salmonella* spp. aquelas grandes, roxas enegrecidas, lisas, brilhantes, convexas com bordas regulares.

Quando as contagens de *Salmonella* spp. decaíram para números abaixo de 100 UFC/g, nas coletas subsequentes, a investigação de *Salmonella* spp. (Presença/Ausência) foi iniciada em paralelo, através do método MDS 3M®, AFNOR BIO 3M 01/16- 11/16:2020.

O MDS 3M® é um método que utiliza amplificação isotérmica mediada por *loops* de DNA alvo únicas com alta especificidade e sensibilidade, combinado com bioluminescência para detectar a amplificação do DNA do patógeno. Resultados

possivelmente positivos são gerados em tempo real e resultados negativos são exibidos após o ensaio estar completo (3M, 2022). Esse é um método que possui diversas certificações, entre elas a AFNOR 3M 01/16–11/16 reconhecida internacionalmente, e que garante a aplicabilidade do método na matriz utilizada. A carne salgada, configura-se como um alimento processado, estando contemplado dentro dessa validação.

Uma vez que houver recuperação de qualquer célula viável, mesmo não cultivável ela será detectada pelo método MDS.

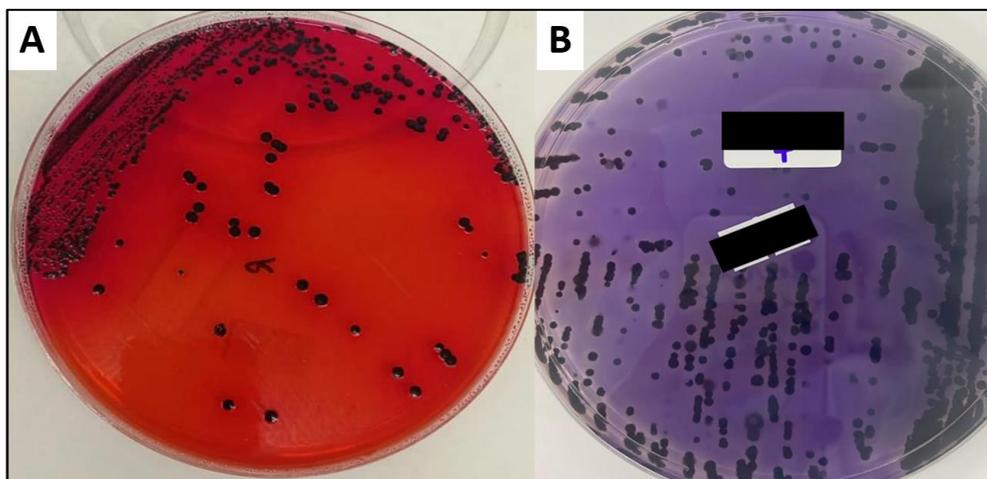
Para essa análise, após a inoculação da amostra nas placas, o saco amostrador contendo 25g de amostra e 225mL de caldo de enriquecimento APT, foi incubado em estufa bacteriológica estabilizada em 41,5°C +/- 1°C por 20 horas. Na etapa seguinte 20uL da amostra foram pipetados para os tubos de Lise, posteriormente esses tubos seguiram para a fase de aquecimento em uma temperatura de 100°C +/- 1°C por 15 minutos e posteriormente resfriados em temperatura ambiente por 5 minutos. Uma nova aliquotagem de 20uL da amostra lisada foi transferida para o tubo de reação. A rack com os tubos de reação foram acoplados dentro do equipamento MDS 3M e o processo de análise iniciado, com resultados emitidos em 60 minutos.

#### 4.6.2 Confirmação das amostras positivas

As placas com colônias características de *Salmonella* spp., bem como as amostras positivas no método de ausência/presença, foram submetidas a confirmação bioquímica e sorológica, seguindo o método da ISO 6579-1:2021 e ISO 6579-3:2021.

Para as placas oriundas das análises de contagem, foram escolhidas três colônias de cada placa e com o auxílio de uma alça de plástico e descartável de 1uL, foi realizado um pequeno toque no centro da colônia e realizado um estriamento em uma nova placa com meio XLD ou MLCB, a fim de verificar a pureza da colônia. A incubação ocorreu em estufa bacteriológica a 36°C ± 2°C, por 22 horas (as placas com isolamento podem ser vistas na Figura 5, A e B). Posteriormente, utilizando as novas placas com culturas fisiologicamente ativas e isoladas, foram realizadas as provas bioquímicas em galeria miniaturizada Bactray® (Laborclin, Paraná, Brasil) para confirmação da identidade das colônias encontradas (a imagem da galeria preparada com colônias isoladas pode ser vista na Figura 6).

**Figura 5 - (A e B).** **A** – Placa de XLD com novo isolamento de *Salmonella* spp., realizado por estriamento utilizando alça descartável de 1uL. **B** – Placa de MLCB, com crescimento característico de *Salmonella* spp., após novo isolamento realizado da mesma forma



Fonte: O autor (2021).

**Figura 6 -** Galeria miniaturizada Bactray. A galeria superior foi inoculada com colônia isolada em meio XLD e a galeria inferior com colônia isolada em meio MLCB, ambas com provas bioquímicas características para *Salmonella* spp



Fonte: O autor (2021).

Para as amostras positivas no método rápido MDS 3M, o procedimento de confirmação iniciou com a transferência de 0,1mL da amostra em APT para 10mL de caldo RVS (*Rappaport Vassiliadis*, Oxoid, Altrincham, Inglaterra) e 1mL para 10mL de caldo MKTTn (Muller Kauffmann Tetratationado com Novobiocina, Oxoid, Altrincham, Inglaterra) recém adicionado de 0,2mL de Iodo-iodeto. A incubação em estufa bacteriológica, dos caldos aconteceu à  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 22 horas e  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 22 horas, respectivamente. Após o período de incubação, com o auxílio de uma alça descartável de 1uL, cada um dos caldos foi estriado para cada uma das placas de XLD e MLCB que seguiram até o fim da confirmação conforme fluxo já citado anteriormente (ISO 6579-1:2021).

Posteriormente à confirmação bioquímica, todas as colônias passaram por confirmação sorológica através do teste de caracterização antigênica utilizando Antissoro O (Difco, Dublin, Irlanda) e Antissoro H (Difco, Dublin, Irlanda), o que configurou o fim do teste. O Antissoro O, também chamado de somático é responsável pela identificação de antígenos localizados na parede celular das células e o Antissoro H, também conhecido como flagelar, permite a identificação de antígenos flagelares presentes nas células de *Salmonella* spp (ISO 6579-1:2021).

#### 4.7 Análises Físico-químicas

Em cada dia de coleta, foram realizados também ensaios de  $a_w$ , teor de sal e pH. Essas análises foram realizadas em duplicata, utilizando amostras sem contaminação artificial de *Salmonella* spp., porém submetidas ao mesmo processo de salga.

O sal foi removido da superfície das peças e para obter uma massa cárnea homogênea, foi necessário realizar a desossa dos pés, manualmente, levando apenas a carne para processo de moagem em equipamento processador Robot Coupe® R2 (Borgonha, França) por 1 minuto.

Na sequência as análises foram iniciadas pela de  $a_w$ , seguindo o método ISO 18787:2017, onde uma pequena alíquota (metade do recipiente) da massa homogênea foi dispersa em uma cápsula limpa e seca, em seguida esta foi introduzida na câmara do analisador de atividade de água AquaLab® Series 4TEV (Mettler Group, Pullman, Washington).

Posteriormente o ensaio de teor de Sal foi realizado seguindo o método 5.6 do MAPA onde 5,000g da amostra homogênea foi pesada em balança analítica (Mettler Toledo, Greifensee, Suíça) e a titulação realizada utilizando uma Bureta Digital Titrette® (Brand, Frankfurt, Alemanha) com indicador Nitrato de Prata 0,1 mol.

Por fim a análise de pH foi realizado seguindo o preconizado na ISO 2917:1999, iniciando com a pesagem de 5g +/-1g em balança analítica, essa amostra foi misturada com 10 vezes do seu peso, de solução de cloreto de potássio 0,1 mol. A mistura foi disposta em um cadinho, levado até o pHmetro (Mettler Toledo, Greifensee, Suíça) e a executado a leitura da amostra.

#### 4.8 Contagem de *Salmonella* em produtos suínos positivos

Em paralelo aos testes de inóculo baixo, médio e alto, um segundo experimento foi realizado a fim de verificar qual a possível contaminação natural e inicial de *Salmonella*

spp. em pés suínos produzidos pela mesma Empresa, treze lotes com resultado previamente positivos para o microrganismo foram submetidos a mesma análise quantitativa, conforme item 4.6.1 e 4.6.2.

De cada lote de pés suínos, foram analisadas 10 amostras, em triplicata, por semeadura direta em ágar MLCB e ágar XLD. O resultado final foi considerado a média da triplicata, resultando assim, em 130 resultados para cada um dos dois métodos de plaqueamento.

#### 4.9 Análises estatísticas

Os resultados dos testes foram registrados em planilha de Excel versão 2019 Microsoft ® Corporation, Redmond, Washington, EUA), as contagens bacterianas foram multiplicadas pela diluição e a expressão do resultando final em UFC/mL, foram convertidos para  $\log_{10}$ . antes do tratamento estatístico.

Todos os resultados das análises microbiológicas e físico-químicos foram analisados estatisticamente pelo software Minitab® versão 21.3 (Pensilvânia, EUA), utilizando ANOVA e teste de Tukey a 5% de significância.

As análises gráficas de comparação de dados entre os crescimentos em Ágar XLD e MLCB, também foram geradas pelo software Minitab® versão 21.3.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Resultados microbiológicos dos três experimentos

Os dados de redução microbiana nos três experimentos são apresentados na Tabela 1. Os valores nela contido, representam a média das contagens das três amostras em triplicatas, durante todo o tempo de execução do processo. O processo de baixo inóculo durou 18 dias e 30 dias para inóculos médio e alto.

As contagens são apresentadas em  $\log_{10}$  e separadamente pelos meios de cultura utilizados XLD e MLCB, a partir da contaminação artificial com três níveis de inóculos.

**Tabela 1** - Sobrevivência de *Salmonella* spp. em pés suínos submetidos à salga seca, por 18 dias, para inóculo baixo, e 30 dias, para inóculo médio e alto

Tempo de Coleta	INÓCULO BAIXO			INÓCULO MÉDIO			INÓCULO ALTO		
	Contagem de <i>Salmonella</i> ( $\log_{10}$ +/- SD)		LAMP	Contagem de <i>Salmonella</i> ( $\log_{10}$ +/- SD)		LAMP	Contagem de <i>Salmonella</i> ( $\log_{10}$ +/- SD)		LAMP
	XLD	MLCB	A/P	XLD	MLCB	A/P	XLD	MLCB	A/P
CI	2,91 ± 0,05 <sup>A; B</sup>	2,95 ± 0,03 <sup>A; A</sup>	NR	5,92 ± 0,15 <sup>A; A</sup>	5,90 ± 0,18 <sup>A; A</sup>	NR	8,14 ± 0,12 <sup>A; A</sup>	8,18 ± 0,12 <sup>A; A</sup>	NR
IS	2,90 ± 0,06 <sup>A; B</sup>	2,92 ± 0,05 <sup>A; A</sup>	NR	5,85 ± 0,24 <sup>A; A</sup>	5,87 ± 0,20 <sup>A; A</sup>	NR	8,10 ± 0,11 <sup>A; A</sup>	8,11 ± 0,11 <sup>A; A</sup>	NR
1H	1,30 ± 0,27 <sup>B; B</sup>	1,61 ± 0,26 <sup>B; A</sup>	P	4,74 ± 0,47 <sup>B; B</sup>	4,90 ± 0,28 <sup>B; A</sup>	NR	7,03 ± 0,12 <sup>B; A</sup>	7,03 ± 0,03 <sup>B; A</sup>	NR
1D	1,16 ± 0,19 <sup>C; B</sup>	1,51 ± 0,22 <sup>C; A</sup>	P	3,94 ± 0,23 <sup>C; A</sup>	4,13 ± 0,30 <sup>C; A</sup>	NR	6,05 ± 0,09 <sup>C; B</sup>	6,14 ± 0,09 <sup>C; A</sup>	NR
4D	NR	NR	NR	3,78 ± 0,32 <sup>C; B</sup>	4,28 ± 0,12 <sup>C; A</sup>	NR	5,94 ± 0,06 <sup>C; B</sup>	6,03 ± 0,05 <sup>D; A</sup>	NR
6D	1,00 ± 0,09 <sup>C; A</sup>	0,98 ± 0,06 <sup>D; A</sup>	P	3,21 ± 0,25 <sup>D; B</sup>	3,84 ± 0,22 <sup>C; A</sup>	NR	5,44 ± 0,23 <sup>D; B</sup>	5,76 ± 0,11 <sup>E; A</sup>	NR
8D	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	P	2,54 ± 0,53 <sup>E; A</sup>	2,87 ± 0,57 <sup>D; A</sup>	NR	5,24 ± 0,23 <sup>E; A</sup>	5,31 ± 0,22 <sup>F; A</sup>	NR
12D	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	P	2,13 ± 0,94 <sup>F; A</sup>	2,36 ± 1,08 <sup>E; A</sup>	NR	5,17 ± 0,03 <sup>E; B</sup>	5,28 ± 0,05 <sup>F; A</sup>	NR
14D	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	P	0,98 ± 0,02 <sup>G; B</sup>	2,23 ± 0,83 <sup>E; A</sup>	NR	4,98 ± 0,05 <sup>F; B</sup>	5,02 ± 0,03 <sup>G; A</sup>	NR
16D	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	P	2,13 ± 0,23 <sup>F; A</sup>	2,07 ± 0,72 <sup>E; A</sup>	NR	4,73 ± 0,04 <sup>G; B</sup>	4,85 ± 0,05 <sup>H; A</sup>	NR
18D	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	A	1,11 ± 0,23 <sup>G; B</sup>	1,80 ± 0,50 <sup>F; A</sup>	NR	4,13 ± 0,05 <sup>H; B</sup>	4,35 ± 0,06 <sup>I; A</sup>	NR
20D	NR	NR	NR	0,95 ± 0,28 <sup>G; B</sup>	1,58 ± 0,55 <sup>G; A</sup>	P	4,06 ± 0,03 <sup>H; B</sup>	4,15 ± 0,03 <sup>J; A</sup>	NR
22D	NR	NR	NR	0,95 ± 0,00 <sup>G; B</sup>	1,48 ± 0,61 <sup>G; A</sup>	P	4,01 ± 0,03 <sup>H; B</sup>	4,08 ± 0,06 <sup>J; A</sup>	NR
24D	NR	NR	NR	0,95 ± 0,00 <sup>G; B</sup>	1,39 ± 0,43 <sup>G; A</sup>	P	1,59 ± 0,10 <sup>I; B</sup>	2,00 ± 0,09 <sup>K; A</sup>	NR
26D	NR	NR	NR	0,95 ± 0,00 <sup>H; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>H; A</sup>	P	0,95 ± 0,00 <sup>J; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>L; A</sup>	P
28D	NR	NR	NR	0,95 ± 0,00 <sup>H; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>H; A</sup>	P	0,95 ± 0,00 <sup>J; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>L; A</sup>	P
30D	NR	NR	NR	0,95 ± 0,00 <sup>H; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>H; A</sup>	P	0,95 ± 0,00 <sup>J; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>L; A</sup>	P

Legenda: NR: Não Realizado; A: Ausente; P: Positivo; IC: imediatamente após a contaminação; IS: Imediatamente após a salga; LAMP: Amplificação Isotérmica mediada por Loop.

Para o primeiro sobescrito, letras diferentes demonstram que houve diferença estatística ao nível de 5% de significância entre os tempos de coleta. Para o segundo sobescrito, letras diferentes demonstram que houve diferença estatística ao nível de 5% de significância entre os métodos de análise.

Os resultados apresentados como 0,95 ± 0,00, foram resultados menores que o limite do método (<10 UFC/g), porém foram informados como 9 UFC, a fim de possibilitar o tratamento estatístico.

Os resultados das amostras do teste com baixa contaminação apresentaram contagens iniciais em XLD de  $2,91 \pm 0,05 \log_{10}$  UFC/g e em MLCB  $2,95 \pm 0,03 \log_{10}$  UFC/g.

Após as primeiras 24 horas de exposição ao sal, houve redução significativa de *Salmonella* spp. em ambos os meios de cultura, ou seja, as contagens foram reduzidas para  $1,16 \pm 0,19 \log_{10}$  UFC/g, em XLD, e  $1,51 \pm 0,22 \log_{10}$  UFC/g, em MLCB.

Após 7 dias de salga, as amostras não apresentaram mais contagem de *Salmonella* spp. em placas, porém ainda foram positivas pelo método qualitativo. Somente após 18 dias de salga, foi possível obter o resultado negativo (Ausente/25g) pelo método MDS LAMP® e confirmado pelo método tradicional, ISO 6579:2021 o que conferiu o fim do teste para o inóculo baixo.

Os pés suínos inoculados com contaminação média apresentaram contagens iniciais em XLD de  $5,92 \log_{10}$  UFC/g e em MLCB  $5,90 \log_{10}$  UFC/g. Após as primeiras 24 horas, houve redução significativa de cerca de 2 log UFC/g, atingindo valores de  $4,74 \pm 0,47 \log_{10}$  UFC/g, em XLD, e  $4,90 \pm 0,28 \log_{10}$  UFC/g, em MLCB. As diminuições seguiram até o dia 26 de exposição ao sal, quando as contagens chegaram a  $<10$  UFC/g em ambos os meios de cultura, porém os resultados foram positivos no método rápido de MDS LAMP®, até o 30º dia, último dia de processo.

As amostras com inóculo alto apresentaram contagens iniciais de  $8,14 \pm 0,12 \log_{10}$ , em XLD, e  $8,18 \pm 0,12 \log_{10}$ , em MLCB. Após as primeiras 24 horas, houve redução significativa de cerca de 2  $\log_{10}$  UFC/g, atingindo valores de  $6,05 \pm 0,09 \log_{10}$  UFC/g, em XLD, e  $6,14 \pm 0,09 \log_{10}$  UFC/g, em MLCB. O comportamento das contagens foi muito semelhante ao experimento com contaminação média, diminuindo significativamente a partir de 24 horas, diminuindo até  $<10$  UFC/g, após 26 dias, porém permanecendo positivas mesmo no último dia do teste.

A ressalga não demonstrou influenciar diretamente no processo de diminuição das contagens, em nenhum dos três níveis de inóculo. Nas primeiras coletas após esse processo, a variação vista, é significativa, mas linear aos decréscimos vistos ao longo dos demais dias do início ao fim do processo.

## 5.2 Resultado da contaminação natural de pés suínos por *Salmonella* oriundos do processo industrial

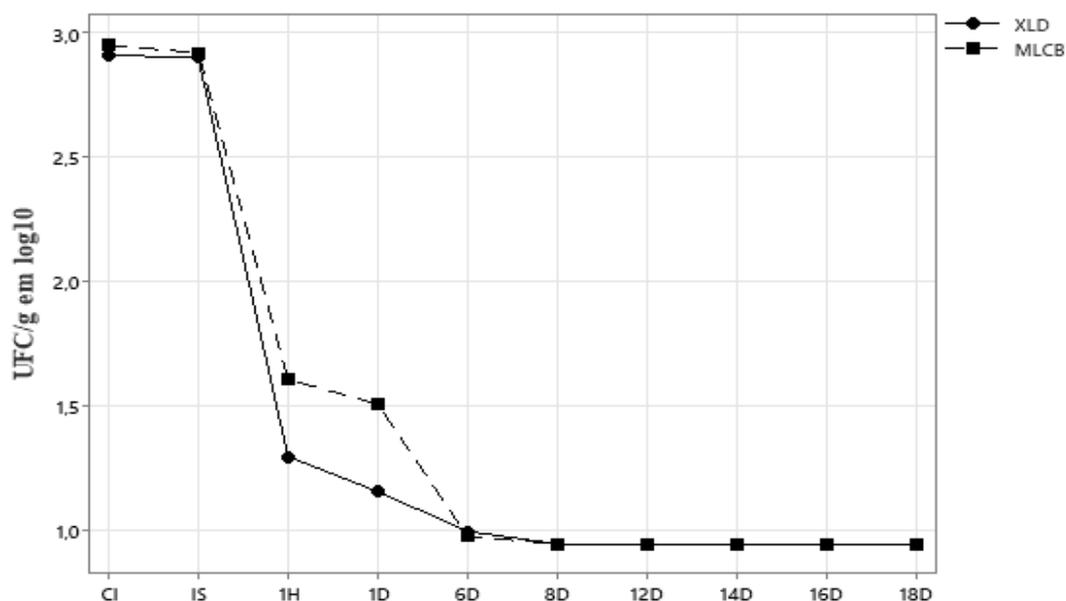
Dentre os 130 pés suínos previamente constatados como positivos para *Salmonella* spp., apenas 2,31% deles apresentaram alguma contagem, as quais não ultrapassaram  $2 \log_{10}$  UFC/g de crescimento. Contagens foram possíveis em apenas três amostras, sendo elas: amostra 1: MLCB:  $1,57 \log_{10}$  UFC/g e XLD:  $1,56 \log_{10}$  UFC/g, amostra 2, apresentou resultado de  $1,48 \log_{10}$  UFC/g, para ambos os métodos e amostra 3, com

resultados de 1,53  $\log_{10}$  UFC/g, no MLCB, e 0,95  $\log_{10}$  UFC/g, no XLD.

### 6.3 Diferença entre contagens em ágar XLD e MLCB

Ao longo dos experimentos, na maioria das coletas, foi possível verificar diferença significativa entre as contagens nos dois meios de cultura utilizados (dados apresentados na Tabela 1). Em praticamente todas as coletas, o ágar MLCB apresentou tendência a um melhor desempenho, pois recuperou mais células quando comparado ao ágar XLD. A diferença foi mais bem vista nos experimentos com baixa e média inoculo do que no experimento de alto inoculo.

**Figura 7** - Demonstração do desempenho dos métodos XLD e MLCB ao longo dos dias do processo de salga no inóculo baixo, os resultados estão apresentados em  $\log_{10}$  UFC/g

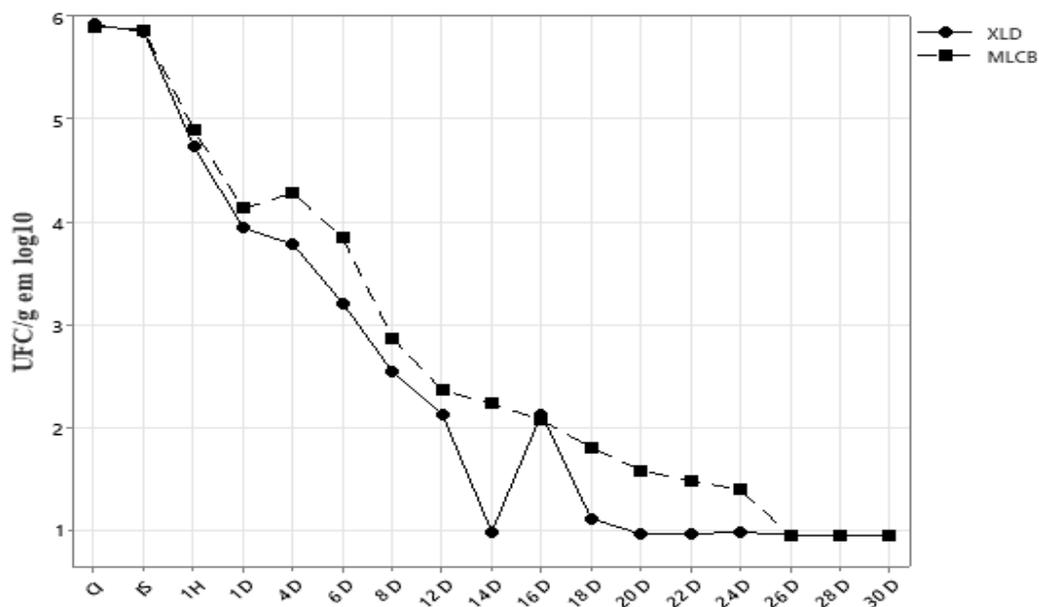


O ponto de 4 dias, foi excluído, a fim de permitir a visualização gráfica.

Foram excluídos também os dias a partir de 18, pois eles não apresentaram contagem.

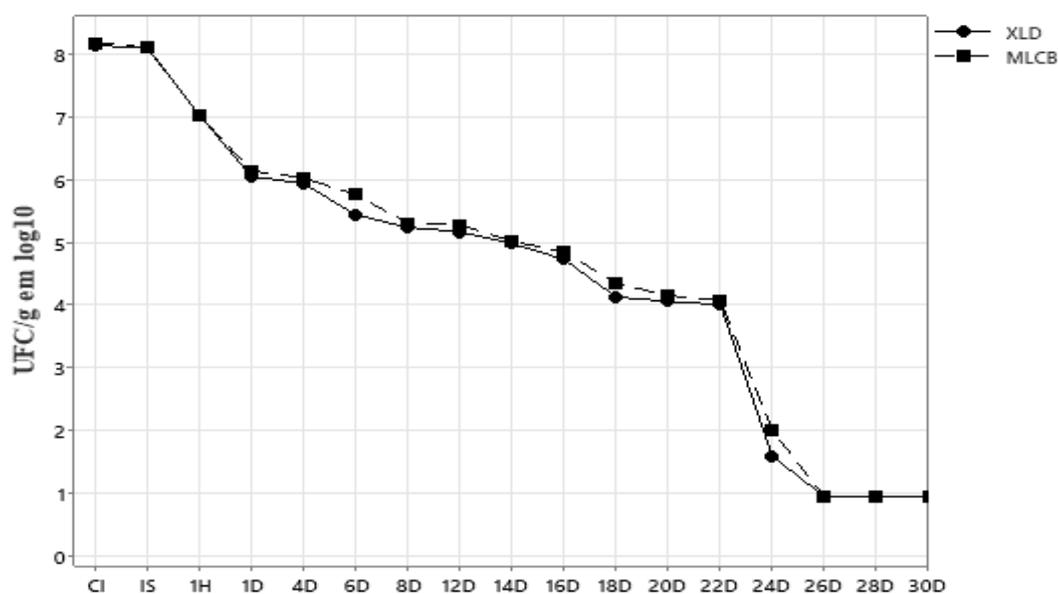
Fonte: O autor (2022).

**Figura 8** - Demonstração do desempenho dos métodos XLD e MLCB ao longo dos dias do processo de salga no inóculo médio, os resultados estão demonstrados em  $\log_{10}$  UFC/g



Fonte: O autor (2022).

**Figura 9** - Demonstração do desempenho dos métodos XLD e MLCB ao longo dos dias do processo de salga no inóculo alto, os resultados estão apresentados em  $\log_{10}$  UFC/g



Fonte: O autor (2022).

#### 6.4 Resultados das Análises Físico-químicas

Os resultados encontrados nos parâmetros Físico-químicos ( $a_w$ , pH e NaCl) apresentaram comportamento linear e bastante semelhante entre os experimentos com os três níveis de inóculo (baixo, médio e alto). Os valores estão apresentados na Tabela 2 e compreendem a média entre as repetições.

**Tabela 2** - Resultados dos parâmetros Físico-Químicos em pés suínos submetidos à salga seca, por 30 dias

Temp o coleta	INÓCULO BAIXO			INÓCULO MÉDIO			INÓCULO ALTO		
	aw	pH	NaCl (%)	aw	pH	NaCl (%)	aw	pH	NaCl (%)
CB	0,996±0,001 <sup>A</sup>	7,25±0,01 <sup>A</sup>	0,45±0,06 <sup>B</sup>	0,996±0,001 <sup>A</sup>	7,25±0,01 <sup>A</sup>	0,45±0,06 <sup>B</sup>	0,996±0,001 <sup>A</sup>	7,25±0,01 <sup>A</sup>	0,45±0,06 <sup>B</sup>
1H	0,765±0,009 <sup>B</sup>	7,40±0,16 <sup>A</sup>	17,90±4,10 <sup>A</sup>	0,765±0,009 <sup>B</sup>	7,40±0,16 <sup>A</sup>	17,90±4,10 <sup>A</sup>	0,765±0,009 <sup>B</sup>	7,40±0,16 <sup>A</sup>	17,90±4,10 <sup>A</sup>
1D	0,760±0,009 <sup>B</sup>	7,38±0,16 <sup>A</sup>	17,67±3,78 <sup>A</sup>	0,765±0,009 <sup>B</sup>	7,38±0,16 <sup>A</sup>	17,82±3,98 <sup>A</sup>	0,762±0,008 <sup>B</sup>	7,41±0,16 <sup>A</sup>	17,87±4,00 <sup>A</sup>
4D	0,758±0,005 <sup>B,C</sup>	7,31±0,17 <sup>A</sup>	15,58±1,88 <sup>A</sup>	0,758±0,005 <sup>B,C</sup>	7,35±0,17 <sup>A</sup>	15,58±1,88 <sup>A</sup>	0,758±0,005 <sup>B,C</sup>	7,31±0,17 <sup>A</sup>	15,58±1,88 <sup>A</sup>
6D	0,755±0,001 <sup>C</sup>	7,34±0,02 <sup>A</sup>	15,30±0,69 <sup>A</sup>	0,755±0,004 <sup>C</sup>	7,34±0,02 <sup>A</sup>	15,30±0,69 <sup>A</sup>	0,755±0,004 <sup>C</sup>	7,34±0,02 <sup>A</sup>	15,30±0,69 <sup>A</sup>
14D	0,753±0,002 <sup>C</sup>	7,47±0,23 <sup>A</sup>	18,48±1,71 <sup>A</sup>	0,753±0,002 <sup>C</sup>	7,47±0,23 <sup>A</sup>	18,48±1,71 <sup>A</sup>	0,753±0,002 <sup>C</sup>	7,46±0,23 <sup>A</sup>	18,48±1,71 <sup>A</sup>
16D	0,754±0,003 <sup>C</sup>	7,44±0,17 <sup>A</sup>	18,85±0,73 <sup>A</sup>	0,754±0,003 <sup>C</sup>	7,44±0,17 <sup>A</sup>	18,85±0,73 <sup>A</sup>	0,754±0,003 <sup>C</sup>	7,44±0,18 <sup>A</sup>	18,85±0,73 <sup>A</sup>
18D	0,755±0,000 <sup>C</sup>	7,41±0,16 <sup>A</sup>	16,75±2,37 <sup>A</sup>	NR	NR	NR	NR	NR	NR
20D	NR	NR	NR	0,755±0,000 <sup>C</sup>	7,41±0,16 <sup>A</sup>	16,75±2,37 <sup>A</sup>	0,755±0,000 <sup>C</sup>	7,41±0,16 <sup>A</sup>	16,75±2,37 <sup>A</sup>
22D	NR	NR	NR	0,755±0,000 <sup>C</sup>	7,38±0,19 <sup>A</sup>	16,02±1,54 <sup>A</sup>	0,755±0,000 <sup>C</sup>	7,38±0,19 <sup>A</sup>	16,02±1,54 <sup>A</sup>
30D	NR	NR	NR	0,753±0,002 <sup>C</sup>	7,49±0,07 <sup>A</sup>	19,43±0,83 <sup>A</sup>	0,753±0,002 <sup>C</sup>	7,49±0,07 <sup>A</sup>	19,43±0,83 <sup>A</sup>

Legenda: CB: Controle Branco; aw: Atividade de água; pH: Potencial de Hidrogênio; NaCl: Teor de Sal, NR: Não realizado. Letras diferentes demonstram que houve diferença estatística ao nível de 5% de significância entre os tempos de coleta.

Os resultados de  $a_w$  apresentaram redução estatisticamente significativa na primeira hora de exposição ao sal, passando de  $0,996 \pm 0,001$  para  $0,765 \pm 0,009$  e apresentando um novo decréscimo em 6 dias de processo, chegando a  $0,755 \pm 0,001$ . Depois disso, os valores de  $a_w$  ficaram estáveis, permanecendo até o fim do experimento.

Os resultados de pH não tiveram alteração significativa entre os tempos de coleta, mantendo-se entre  $7,25 \pm 0,01$  a  $7,49 \pm 0,07$ , do início ao fim do experimento, independentemente do nível de inóculo utilizado.

Como esperado, o NaCl apresentou aumento significativo na primeira hora de salga, subindo de  $0,45\% \pm 0,06$  para  $17,90\% \pm 4,10$ . Em seguida, os valores se mantiveram estáveis, sem novas alteração significativa até a finalização do experimento, ou seja, dia 18 para nível baixo e dia 30 para nível médio e alto.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo demonstraram reduções significativas das populações de *Salmonella* spp. inoculadas em pés suínos em apenas 24 horas de exposição ao sal. Tais reduções foram observadas nos três níveis de inóculos avaliados. Esse efeito pode ser explicado pelo fato de que a exposição ao sal desidrata a carne, diminuindo a disponibilidade de água livre necessária às células bacterianas. Os valores de  $a_w$ , inicialmente de  $0,996 \pm 0,001$  foram reduzidos para  $0,765 \pm 0,009$ , nas primeiras 24 horas de salga, comprovando a menor disponibilidade de água livre.

Condições semelhantes, porém, apresentando uma redução mais lenta, foram observadas na salga de peixes do tipo cavala, onde grupos amostrais A (sal/peixe = 80/100) e B (sal/peixe = 30/100) atingiram valores de  $0,748 \pm 0,024$  e  $0,773 \pm 0,026$ , respectivamente, em cinco dias de salga (MOL et al. 2010).

Kinsella et al. (2007) comprovou que a diminuição de  $a_w$  é uma grande aliada para a destruição celular principalmente quando associada a outros fatores de estresse, como por exemplo, a temperatura. No seu estudo, pedaços de carne foram submetidos a contaminação de *S. Typhimurium* DT104 e posteriormente expostos a soluções de estresse osmótico e incubadas a baixas temperaturas ( $4^\circ\text{C}$  e  $10^\circ\text{C}$ ), por 72 horas. Os resultados das contagens em Ágar TSA (Ágar de Triptona de Soja) e XLD, da superfície da carne comprovaram a diminuição significativa da contagem do microrganismo quando as amostras estavam com  $a_w$  reduzida, 0,79 (com  $1970 \text{ mOsm}^{-1}$ ) armazenada em  $4^\circ\text{C}$  e 0,79 (com  $1970 \text{ mOsm}^{-1}$ ) e 0,86 (com  $1285 \text{ mOsm}^{-1}$ ) armazenadas em  $10^\circ\text{C}$ , por 72 horas.

No presente estudo, o tempo máximo de 30 dias não foi capaz de eliminar totalmente *Salmonella* spp. nos experimentos contendo inóculos médios e altos, ainda que, após 26 dias, tenha havido uma redução de seis e oito  $\log_{10}$  UFC/g, respectivamente. Porém mesmo sem apresentar contagem do microrganismo em placas, ambos os experimentos mantiveram resultados positivos no método qualitativo, indicando a presença de *Salmonella* spp. Essa condição foi confirmada com o isolamento do microrganismo no método tradicional (ISO 6579-1:2021) na etapa confirmatória da mesma amostra, iniciada posteriormente ao resultado positivo no MDS 3M.

A inativação total de *Salmonella* spp demonstrou ser dependente do tamanho do inóculo, indicando que quanto maior a população inicialmente presente na amostra, maior será o tempo necessário para a sua inativação completa. Em contrapartida, o inóculo baixo de *Salmonella* spp. necessitou 18 dias para ser totalmente inativado, apresentando resultados negativos no método qualitativo e ausência de crescimento pelo método

quantitativo.

Um método para possuir validação pela AFNOR, necessita passar por um rigoroso processo de validação para ser aprovada. Essa validação é conduzida seguindo as determinações da norma ISO 16140-2:2016. Dentre os parâmetros que devem ser atendidos, está a necessidade de submissão de diferentes condições, entre elas a utilização de matrizes contaminadas com o microrganismo alvo, com microrganismo interferente, com baixos inóculos e amostras condicionadas por algum tipo de estresse (ISO 16140-2:2016).

Diante disso entende-se que o método utilizado para determinação qualitativa é adequado para todos os resultados encontrados, tanto os negativos quanto positivos. Importante ressaltar que todos os resultados positivos foram confirmados pelo método tradicional ISO 6579:2021.

*Salmonella* spp. é uma bactéria entérica responsável pela salmonelose, uma doença severa. Com base nisso, indústrias alimentícias devem seguir requisitos microbiológicos para garantir a segurança de seus produtos. Por exemplo, durante o processo de produção, os abatedouros frigoríficos de suínos precisam realizar ciclos oficiais de amostragem para testar *Salmonella* spp. em carcaças, com o objetivo de monitorar uma prevalência permitida de 12% ou menos. Quando esses ciclos oficiais são violados, ou seja, apresentam positividade maiores do que o permitido, medidas corretivas e preventivas devem ser tomadas para garantir a segurança dos produtos suínos. As principais ações que devem ser tomadas são a investigação para identificação da causa, revisão dos programas de autocontrole, elaboração e aplicação de plano de ação construído, comprovação ao SIF da tomada de ação e dos resultados (BRASIL, 2018).

De acordo com a Instrução Normativa nº 161 de 6 de julho de 2022, o padrão microbiológico da carne suína e da carne suína salgada crua comercializada é a ausência de *Salmonella* em cinco amostras de 25g (ANVISA, 2022). Quando esses produtos suínos não estão de acordo com esses padrões microbiológicos, intervenções podem ser aplicadas para eliminar o perigo. Muitas intervenções são aprovadas para tratar esses produtos em todo o mundo, como intervenções químicas por meio do uso de adjuvantes tecnológicos que atuam como antimicrobianos, como ácidos orgânicos, cloro (USDA, 2016), oxidantes (USDA, 2016) ou processos físicos, como o uso de calor seco/úmido (EFSA, 2011; PIVOTO et al., 2015), aspersão a vapor, luz ultravioleta, irradiação ionizante, processamento sob alta pressão (USDA, 2016), entre outras.

No Brasil, apenas o tratamento térmico é permitido para esse fim e deve seguir

o binômio tempo-temperatura de 71,1°C, por 3 minutos, ou 72°C, por 15 minutos (MAPA, 2022). No “Manual de procedimentos de verificação e inspeção de carnes e derivados em estabelecimentos brasileiros registrados no serviço de inspeção federal (SIF)” é mencionado que o tratamento térmico de lotes positivos para *Salmonella* deve reduzir de 6,5 a 7,0 logs (MAPA, 2021). Nos experimentos apresentados no presente estudo, reduções semelhantes de *Salmonella* foram alcançadas como resultado do processo de salga. Esses resultados são importantes porque também foi demonstrado que a contaminação por *Salmonella*, que ocorreu no processo industrial dos pés suínos, resultou em níveis muito menores (máximo de 1,57 log<sub>10</sub> UFC/g), indicando que a salga seca pode ser uma alternativa interessante para reduzir significativamente ou eliminar totalmente *Salmonella* spp. de pés suínos. Os resultados obtidos nos experimentos com inóculos baixos de *Salmonella* reforçam essa possibilidade.

Alguns estudos relataram que a quantidade de células viáveis encontradas em amostras de carne suína é inferior a 10 UFC/g, como é o caso dos resultados apresentados por Mann et al. (2014), onde foram avaliados linfonodos ileocecais suínos de 540 animais divididos em 180 *pools*, sendo que apenas sete *pools* foram positivos no método qualitativo. Van Damme et al. (2018) também estudaram a quantificação de *Salmonella* spp. em um estudo realizado em matadouros na Flandres, na Bélgica. Os autores identificaram positividade de *Salmonella* em 30% das amostras de conteúdo retal de suínos durante o abate, mas nenhuma amostra com contagem superior a 10 UFC/g.

Resultados similares de contagens de *Salmonella* foram encontrados neste estudo, quando dez lotes de pés suínos foram segregados na indústria, devido à positividade de *Salmonella* spp. Os lotes foram analisados pelo método rápido LAMP 3M, que possibilita a identificação de *Salmonella* spp através da amplificação de seus ácidos nucleicos, com limites de detecção de 1 a 5 UFC por amostra (3M, 2022). Isso sugere que as amostras anteriormente positivas para o método LAMP 3M possuíam uma população bacteriana de 1 a 9 UFC/g, não sendo capaz de expressar crescimento no plaqueamento direto em ágar XLD e MLCB.

Boughton et al. (2007) apresentaram dados referentes a quantificação de *Salmonella* spp. no ambiente de espera de um abatedouro frigorífico de suínos. O estudo contou com os resultados de 359 suabes coletados após higienização, nos currais, em três pontos, durante dois dias. No primeiro dia, o número médio das contagens foi de 1,8 UFC/100cm<sup>2</sup>, e no segundo dia 8 UFC/100cm<sup>2</sup>, sendo o sorogrupo mais prevalente o da *S. Typhimurium*. Segundo os autores, o que pode ter contribuído para a redução da população

de *Salmonella* foi o fato de as amostras terem sido expostas a mais de uma condição de estresse, como a baixa  $a_w$  e a temperatura de armazenamento, pois todo o experimento foi mantido em temperaturas de 4°C a 9 °C. Vários estudos demonstraram a dificuldade de desenvolvimento de *Salmonella* spp. após sua exposição a duas condições de estresse, como o de Duc et al. (2018), que testaram a combinação de fagos e baixa temperatura de armazenamento para reduzir *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Roy et al. (2021) demonstraram redução significativa da formação de biofilme em superfícies de plástico, borracha e pele de frango por *S. Kentucky* quando o microrganismo foi submetido a temperaturas mais baixas (4°C), adicionado a uma condição de pH inferior a 4,0.

Os pés suínos utilizados no presente estudo são alimentos que não devem ser consumidos crus, portanto, mesmo que a carne apresente um nível de contaminação superior a  $1 \times 10^6$  UFC/g, o processo de cozimento utilizado para o preparo do alimento poderá auxiliar na eliminação de células viáveis, sobreviventes do processo de salga. Essa condição é comprovada pelos estudos de Gurman et al. (2016), que testaram a inativação de *Salmonella* spp. em hambúrguer suíno, após o cozimento, demonstrando que para cada 1°C de aumento de temperatura ocorreu a diminuição de  $0,2407 \log_{10}$  UFC/g, sendo que para ocorrer a redução de  $5 \log_{10}$ , foi necessária a temperatura de 63°C.

Em relação aos dois meios de cultura utilizados para contagens em placas, foi possível verificar que o ágar MLCB apresentou um desempenho levemente melhor na recuperação da *Salmonella* spp. em relação ao XLD. Essa condição provavelmente ocorreu devido à composição dos meios utilizados, pois o XLD possui apenas uma fonte principal de energia, o extrato de levedura. Já o ágar MLCB adicionalmente ao extrato de levedura, possui outras duas fontes de energia, o extrato de carne e a digestão enzimática de tecido animal. Esses componentes do MLCB são importantes fontes de nutrientes como nitrogênio, vitaminas, minerais e aminoácidos, o que podem torná-lo melhor na recuperação de células injuriadas.

## 7. CONCLUSÃO

O processo de salga foi capaz de eliminar quantidades significativas de *Salmonella* spp. nos pés suínos, dentro de 24 horas, sendo que reduções muito maiores foram obtidas em períodos maiores. O processo de ressalga demonstrou não ser necessário para garantir esses resultados.

Níveis baixos ( $1 \times 10^2$  UFC/g) de *Salmonella* não foram mais observados sobre placas no sétimo dia, enquanto os inóculos médio ( $1 \times 10^5$  UFC/g) e alto ( $1 \times 10^8$  UFC/g) não foram quantificados em placas depois de 26 dias de salga. O inóculo baixo atingiu resultado negativo para o método qualitativo em 18 dias de salga, já os inóculos médio e alto permaneceram positivos até o fim do experimento.

Os parâmetros físico-químicos se comportaram semelhantes, para os três níveis de inóculo. A  $a_w$  reduziu significativamente já na primeira hora e após com novo decréscimo no sexto dia, iniciando com  $0,996 \pm 0,001$  para  $0,765 \pm 0,009$  e apresentando um novo decréscimo em 6 dias de processo, chegando a  $0,755 \pm 0,001$ . O pH não apresentou variação significativa durante todo o processo permanecendo em  $7,25 \pm 0,01$  a  $7,49 \pm 0,07$ , do início ao fim do experimento. Já o teor de sal como esperado, apresentou aumento significativo na primeira hora de salga, indo de  $0,45\% \pm 0,06$  para  $17,90\% \pm 4,10$ . Em seguida, os valores se mantiveram estáveis, até a finalização do experimento.

Os dois meios de cultura utilizados foram capazes de recuperar *Salmonella* spp. de forma linear e muito semelhante entre si, porém o Ágar MLCB apresentou contagens significativamente maiores que o Ágar XLD, indicando melhor recuperação de células de *Salmonella*, principalmente nos níveis de inóculo baixo e médio.

Considerando que os níveis de *Salmonella* encontrados em pés suínos naturalmente contaminados na indústria foram muito mais baixos ( $1,57 \log_{10}$  UFC/g) que as reduções obtidas pela salga seca (6 a  $8 \log_{10}$  UFC/g), esse processo pode ser considerado uma alternativa ao processo térmico.

O processo de salga aplicado nesse trabalho teve seu resultado comprovado e de forma eficaz, demonstrando a possibilidade da utilização em escala industrial com a finalidade de reduzir significativamente e/ou eliminar totalmente contaminação por *Salmonella* no produto pés suínos salgados.

Com a implantação desse processo, as toneladas de produtos antes encaminhados para descarte como subprodutos, poderão ser destinados ao consumo de forma segura.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. *Relatório anual 2022*. 2022. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/01/abpa-relatorio-anual-2022.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2022.
- ANVISA. INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022. *Diário Oficial da União*: nº 126, de 6 de julho de 2022 Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN\\_161\\_2022\\_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_161_2022_.pdf/b08d70cb-add6-47e3-a5d3-fa317c2d54b2). Acesso em: 05 dez. 2022.
- ARKOUDELLOS, J.S.; SAMARAS, F.J; TASSOU, C.C. Survival of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis on Salted Sardines (*Sardina pilchardus*) during Ripening. *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 8, p. 1479-1481, 2003.
- BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. *Fundamentos de tecnologia de alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1998.
- BERENDS, B.R. et al. Impact on human health of *Salmonella* ssp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. *International Journal of Food Microbiology*, v.44, n.3, p.219-229, 1998.
- BOTTELDOORN, N. et al. *Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination on the slaughterhouse. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, n. 5, p. 891-903, 2003.
- BOUGHTON, C, et al. Quantitative examination of *Salmonella* spp. in the lairage environment of a pig abattoir. *Foodborne Pathog Dis*, v.4, n.1, p.26-32, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Instrução Normativa nº 60/2018 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA)*. 2018. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/Perguntas-e-respostas-IN\\_60\\_2018#:~:text=A%20Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%20N%C2%BA%2060,de%20Produtos%20de%20Origem%20Animal](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/Perguntas-e-respostas-IN_60_2018#:~:text=A%20Instru%C3%A7%C3%A3o%20Normativa%20N%C2%BA%2060,de%20Produtos%20de%20Origem%20Animal). Acesso em: 15 nov. 2022.
- CASTELIJN, G.A.C, et al. Surface behaviour of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* e *S. Infantis*. *Veterinary Microbiology*, v.161, p. 305-314, 2013.
- CDC. Summary of Possible Multistate Enteric (Intestinal) Disease Outbreaks in 2021. *Centers for Disease Control and Prevention*. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/outbreaks/multistate-outbreaks/annual-summaries/annual-summaries-2021.html>. Acesso em: 15 ago. 2023.
- CÊ, E.R. *Influência das etapas do processo de abate de suínos na prevalência de patógenos e níveis de microrganismos indicadores de qualidade e higiene*. 2016. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, Paraná, 2016.
- CHABBOUH, M. et al. Studies on the salting step of Tunisian kaddid meat:experimental

kinetics, modeling and quality. *Food Bioprocess Technology*, v.5, n.5, p.1882–1895, 2012.

CHIN, W.H, et al. Direct PCR – A rapid method for multiplexed detection of different serotypes of Salmonella in enriched pork meat samples. *Molecular and Cellular Probes*, v.32, p. 24-32, 2017.

CORBELLINI, L.G. Effect of slaughterhouse and day of sample on the probability of a pig carcass being Salmonella-positive according to the Enterobacteriaceae count in the largest Brazilian pork production region. *International Journal of Food Microbiology*, v. 228, p. 58-66, 2016.

DUC, H.M. Isolation and application of bacteriophages to reduce Salmonella contamination in raw chicken meat. *LWT*, v. 91, p. 353-360, 2018.

EFSA. Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). *EFSA Journal*, v. 9, n. 10, p. 2351, 2011.

EFSA; ECDC. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, v. 20, n.12, p. 7666, 2022.

EMBRAPA. *Revisão e modernização dos procedimentos de inspeção ante e post mortem aplicados em abatedouros frigoríficos de suínos com Inspeção Federal*. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/208549/revisao-e-modernizacao-dos-procedimentos-de-inspecao-ante-e-post-mortem-aplicados-em-abatedouros-frigorificos-de-suinos-com-inspecao-federal>. Acesso em: 15 nov. 2022.

EMBRAPA. *Modernização da inspeção sanitária em abatedouros de suínos - Inspeção baseada em risco (Opinião Científica)*. 2019. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/200935/1/final9146.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2022.

EMBRAPA. *Estatísticas | Brasil | Suínos - 2022*. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/suinos/brasil>. Acesso em: 15 nov. 2022.

FORSYTHE, S. J. *Microbiology of food safety*. 2ed. Wiley-Blackwell, 2013.

GURMAN et al. Thermal inactivation of Salmonella spp. in pork burger patties. *Journal of Food Microbiology*, v. 219, p. 12-21, 2016.

HARRISON, O.L. et al. Salmonella enterica 4,[5],12:i:-, an Emerging Threat for the Swine Feed and Pork Production Industry. *Journal of Food Protection*, v. 85, n. 4, p. 660-663, 2022.

HURD, H.S. et al. Rapid Infection in Market-Weight Swine Following Exposure to a Salmonella Typhimurium-Contaminated Environment. *American Journal of Veterinary Research*, v. 68, n. 2, p. 1194-1197, 2001.

ISO. 16140-2:2016- *Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*:

International Organization for Standardization (ISO), 2021. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/54870.html>. Acesso em: 15 mar. 2023.

ISO. ISO 2917:1999 - *Meat and meat products. Measurement of the pH*: International Organization for Standardization (ISO), 1999. Disponível em: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/24785/9861ea639264453ea88995b72d9c4ba5/ISO-2917-1999.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2022.

ISO 18787:2017. *Foodstuffs — Determination of water activity – AW*. International Organization for Standardization (ISO), 2017. Disponível em: <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/63379/23d8fe4b776149fcb7b4cb0fd89d28c8/ISO-18787-2017.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2022.

ISO. 6579-1:2021- *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella spp.*: International Organization for Standardization (ISO), 2021. Disponível em: <https://www.gso.org.sa/store/standards/GSO:794929/GSO%20ISO%206579-1:2021-Amd%201:2021?lang=en>. Acesso em: 15 mar. 2023.

ISO. 6579-3:2021- *Microbiologia da cadeia produtiva de alimentos - Método horizontal para a detecção, enumeração e sorotipagem de Salmonella - Parte 3: Diretrizes para sorotipagem de Salmonella spp.*: International Organization for Standardization (ISO), 2021. Disponível em: <https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/11272/abnt-iso-tr6579-3-microbiologia-da-cadeia-produtiva-de-alimentos-metodo-horizontal-para-a-deteccao-enumeracao-e-sorotipagem-de-salmonella-parte-3-diretrizes-para-sorotipagem-de-salmonella-spp>. Acesso em: 15 mar. 2023.

KICH, J.D.; SOUZA, J.C.P.V.B. Salmonela na suinocultura brasileira: do problema ao controle. *Embrapa*. 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355242/0/Salmonela+na+suinocultura+brasileira+-+Do+problema+ao+controle.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2022.

KINSELLA, K.J. et al. The influence of attachment to beef surfaces on the survival of cells of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, at different AW values and at low storage temperatures. *Food Microbiology*, v. 24, n. 7–8, p. 786-793, 2007.

LIMA, E. C. et al. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, n.4, p.186-190, 2004.

LOPES, R.L.T. *Dossiê Técnico. Conservação de alimentos*. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais CETEC. 2007. Disponível em: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MjEz>. Acesso em: 05 mar. 2023.

MANN, E. et al. Rapid testing and quantification of *Salmonella* in ileocaecal lymph nodes of Austrian porks slaughtered for consumption. *Research in Veterinary Science*, v. 97, n. 2, p. 187-190, 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal*. Secretaria de Defesa Agropecuária. Método

Teor de Sal, método 5.6 – Brasília: MAPA, 2019.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Aves: Manual de procedimentos de inspeção e fiscalização de aves e derivados em estabelecimentos sob inspeção federal (SIF)*. 2021. Disponível em: <https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Inspe%C3%A7%C3%A3o-Animal/manual-inspe%C3%A7%C3%A3o-aves>. Acesso em: 05 mar. 2023.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Carnes: Manual de procedimentos de inspeção e fiscalização de carnes e produtos cárneos em estabelecimentos registrados sob inspeção federal (SIF)*. 2022. Disponível em: [https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Inspe%C3%A7%C3%A3o-Animal/manual\\_produtos\\_carneos](https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Inspe%C3%A7%C3%A3o-Animal/manual_produtos_carneos). Acesso em: 05 mar. 2023.

MARIN, C. et al. Contamination of pig carcass with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1,4[5],12:i:- originates mainly in live animals. *Science of The Total Environment*, v. 703, p. 134609, 2020.

MOL, S. et al. Survival of *Salmonella* Enteritidis during salting and drying of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, v.139, n. 1–2, p. 36-40, 2010.

MOURA-ALVES et al. Hygiene Indicators and *Salmonellae* on Surfaces of Swine Carcasses from Two Slaughterhouses in Northern Portugal. *Journal of Food Protection*, v. 85, n. 11, p. 1566-1575, 2022.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp.* Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2011. Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_tecnico\\_diagnostico\\_laboratorial\\_salmonella\\_spp.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_laboratorial_salmonella_spp.pdf). Acesso em: 15 nov. 2022.

NETO, P.A.S. et al. Revisão sistemática sobre carnes salgadas e seus processos de qualidade. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 15, p. 212101522389, 2021

PERUZY, M.F. et al. Evaluation of microbial contamination of different pork carcass areas through culture-dependent and independent methods in small-scale slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*, v. 336, p. 108902, 2021.

PISSETTI, C. et al. Detecção de *Salmonella* entérica e *Listeria monocytogenes* em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 40, n.4, p.1071. 2012.

PIVOTTO, M. et al. Redução na contaminação superficial de carcaças suínas: um processo alternativo. *Revista de Agricultura*, v.90, n.1, p. 54 - 62, 2015.

REYNOLDS et al. Validation of dry cured ham process for control of pathogens. *Journal of Food Science*, v. 66, n. 9, p. 1373-1379. 2001.

ROY, P.K. et al. Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. *Poultry Science*, v. 100, n. 7, p. 101209, 2021.

RUSSEL, S.M. *Controlling Salmonella in Poultry Production and Processing*. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.

SALVATIERRA, C. M. *Microbiologia*. São Paulo: Editora Saraiva, 2014. E-book. ISBN 9788536530550. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788536530550/>. Acesso em: 26 jun. 2023.

SHAHIDI, F.; SAMARANAYAKA, A.G.P.; PEGG, R.B. CURING | Brine Curing of Meat. *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)*, p. 416-424, 2014.

SMET, C. et al. Influence of the growth morphology on the behavior of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* under osmotic stress. *Food Research International*, v. 77, n.3, p. 515-526, 2015.

SWANENBURG et al. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. *International Journal of Food Microbiology*, v.70, n.3, p.231-242, 2001.

TAORMINA, P.J. Meat and Poultry: Curing of Meat. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, v. 2, p. 501-507, 2014.

USDA. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. *Guidelines for the Control of Nontyphoidal Salmonella Spp. in Beef and Pork Meat*. 2016. Disponível em: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/en/>. Acesso em: 13 mai. 2023.

VAN DAMME, I. Quantification of hygiene indicators and *Salmonella* in the tonsils, oral cavity and rectal content samples of porks during slaughter. *Food Microbiology*, v. 71, p. 120-128, 2018.

YOUSEF, A.E.; JUNEJA, V.K. *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 2002.

3M. *Product Instructions MDA2SAL96*. Molecular Detection Assay 2 – *Salmonella*. 2022. Disponível em: <https://multimedia.3m.com/mws/media/1129363O/mda-2-salmonella-product-instructions.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2023.

## APÊNDICE

### Survival of *Salmonella* spp. during dry salting process of pork products (pork feet)

Rafaela Busnello <sup>1,2\*</sup>, Luisa Aneiros Gené <sup>1</sup>, Mariane Ferreira Silva<sup>1</sup>, Nathanyelle Soraya Martins de Aquino <sup>2</sup>, Eduardo Cesar Tondo <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Food Company, Rodovia RS 324, Km 76.2 s/n – Bairro Santa Rita – Marau/RS – 99.150-000, Brazil; rafaela.busnello@hotmail.com; luisa\_gene@yahoo.com.br; ferreirasilva.mariane@gmail.com

<sup>2</sup>Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500. Bairro Agronomia. Porto Alegre, RS. Brazil; nathanyelleaquino@gmail.com; tondo@ufrgs.br

\*Correspondence: rafaela.busnello@hotmail.com; Tel.: +55 54991731615

**Abstract:** Thermal processing to eliminate pathogens is common practice for positive batches of meat products. However, this processing is not financially transformed for lower value-added products, such as pig feet, resulting in meat disposal. A cheap process capable of eliminating the *Salmonella* pathogen from these products can be an alternative to avoid food waste. This research aimed to evaluate the survival of *Salmonella* in pig's feet (PF) patent to the salting process. The FPs were artificially contaminated with a pool of *Salmonella* serovars at three levels: low, medium and high, and then stored at 8-10°C for up to 30 days. *Salmonella* survival was evaluated by direct counts on XLD Agar (Xylose Lysine Deoxycholate Agar) and MLCB Agar (Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green Agar) and by molecular assay. Furthermore, the quantification of *Salmonella* spp. was performed on naturally contaminated PF. Satisfactory results required 18 days for the complete elimination of microorganisms in the low-inoculum Exceptions. As for the medium and high inoculum sample, it took 26 days for the population to decrease to the limit of quantification of the technique (10 CFU/g), but the positive results remained positive in the molecular method until the end of the experiment (30 days). The maximum *Salmonella* counts found in naturally contained FP were 1.57 log<sub>10</sub> CFU/g, the reductions achieved by the applied salting process being much greater than this amount of *Salmonella*.

**Keywords:** Antimicrobial interventions, pork, *Salmonella enterica*, Pork production chain, Microbial reduction, Aw.

## 1. Introduction

As it happens to all major pork producers, some batches of pork meat can be contaminated with *Salmonella*, one of the most relevant food pathogens worldwide. This microorganism can be found in the intestinal tract of pork and other warm-blooded animals (Simons et al., 2016), so it can be possible to enter the production chain during breeding, transport, waiting in the stalls, slaughter, and processing of pork carcasses. Decontamination methods during the slaughtering process are helpful to improve the quality and safety of pork meat products. The decontamination method can be divided into the following categories: physical treatment, such as cold or hot water washing, steaming, and irradiation, and chemical treatment using organic acids, chlorine (brine solutions, salting), ozone, trisodium phosphate, and cold plasma technology (Sammanee et al., 2022).

In pork industry, lots contaminated with the genus *Salmonella* are usually thermally processed, since *Salmonella*, as they do not form endospores, become heat-sensitive and are easily inactivated by temperatures of 60°C or higher (Forsythe, 2013). However, products with lower added value, such as pork feet, ears, muzzles, tails, and ribs are frequently discarded when contaminated with *Salmonella* spp. Because of the fact that their thermal processing is not financially viable. Dry salting those by products can be a viable alternative to reduce microbiological contamination. Salting is one of the oldest food preservation methods, and it consists of adding sodium chloride (NaCl) on foods which slows the bacterial growth and inhibit enzyme activity (Binici & Kurt Kaya, 2018). Salted pork products are used in one of the most famous Brazilian dishes, the *feijoada*, consumed throughout the national territory and in several other countries, and beside that are also in demand in diverse international markets, due to the culture of certain countries. *Feijoada* is a typical dish composed mainly of black beans, different parts of the pig, sausage, flour and a side of greens and vegetables.

Meat salting of meat can be carried out using a dry or a wet process. According to Chabbouh et al. (Chabbouh et al., 2012), dry salting is equivalent to wet salting and can be more efficient than the later, as the loss of water from the tissue that occurs in the first two hours of dry salting is greater than that of wet salting. In addition, dry salting causes greater dehydration of the product when compared to wet salting, performed with higher levels of NaCl. Salting decreases, the water activity of pork feet, inhibiting microbial multiplication and contributing to microbiological quality. Although this process may contribute to the conservation of pork feet, its effect on *Salmonella* inactivation is still unclear.

The present study aimed to evaluate the survival of *Salmonella* spp. in pork feet submitted to dry, salting process during 30 days and to evaluate the performance of MLCB and XLD agars in the recovery of *Salmonella* in these products.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. *S. strains and inoculum preparation*

In this study, seven *Salmonella* serovars were used: *S. Typhimurium* ATCC 14028, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Panama*, *S. Minnesota*, *S. Derby*, and *Salmonella* monophasic (*S. Typhimurium* without expression of the second phase of the H antigen, characterized by the antigenic formula: 1,4,[5],12:i:-). Except for the ATCC strain, all the other *Salmonella* serovars were isolated from pork meat samples, which had their identification confirmed by the Check & Trace *Salmonella* method (Check-Point) in a food company. The cultures of each isolate were stocked in Brain Heart Infusion broth (Oxoid, Altrincham, England) with 30% glycerol. Before the experiments, a colony of each isolate was inoculated separately on Nutrient Agar (Oxoid, Altrincham, England) and incubated at 36°C±1°C for 18 hours, until reached the stationary phase. Then, a suspension of each culture was prepared in 5mL of 0.85% saline solution, subsequently centrifuged, and washed with 10mL of 0.85% saline solution. Then, 0.3mL of each culture was added to a sterile tube, composing a *Salmonella* pool sorovars. After that, the pool was diluted in 0.85% saline solution until it reached approximately 1x10<sup>8</sup> CFU/mL, and this concentration was measured with the aid of a densitometer Densimat (Densimat, BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) with a wavelength of 950nm.

A drop of food-grade ARCOLOR® blue dye was added to the pool to monitor the homogeneous spread of the inoculum over the surface of the pork feet described below.

### 2.2. *Pool inoculation on pork feet*

The experiments were carried out in the municipality of Marau/RS, Southern Brazil. Pork feet cut in half, vertically, were supplied by a local slaughter industry located in the municipality of Concórdia/SC, Southern Brazil.

Before artificial inoculation, lots of pork feet (composed of 100 half-foot units) were analyzed for the presence of *Salmonella* spp. by 3M™ Molecular Detection Assay 2 (MDA) *Salmonella* (Afnor, 2020). Analyzes were performed on ten random samples per batch, and

only *Salmonella*- free batches were inoculated.

For inoculation, the *Salmonella* pool spp. was diluted in 0.85% saline solution, and 1mL of specific dilutions was dispensed separately on the surface of each pork foot. The samples were inoculated with three levels of *Salmonella* inoculum, which were identified as low ( $1 \times 10^2$  CFU/g), medium ( $1 \times 10^5$  CFU/g), and high ( $1 \times 10^8$  CFU/g) inoculum. Pork feet inoculation was carried out on the inner face (meat part) and on the outer face (part of the skin) of each foot. After the inoculation, samples were kept for 20 to 30 minutes at  $9^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  until complete absorption of the inoculum.

### 2.3. Dry salting process simulation

Artificially contaminated samples and negative controls (non-inoculated feet) were weighed and placed inside sterile plastic bags. Then, samples were salted, adding 0.06% dry iodized salt, respecting the proportion of 25% of the total weight of the samples. Each bag was then closed and homogenized manually for 8 - 10 minutes.

The feet were arranged in hollow trays to allow the elimination of water during the salting process, and they were placed in a refrigerator with a temperature of  $8^\circ\text{C} - 10^\circ\text{C}$ . The temperature was monitored daily with a calibrated digital thermometer, type AK22 (AKSO, São Leopoldo, Brazil).

On the fifth day of salting, the feet were again subjected to the same process. They were removed from the refrigerator, weighed and salted again with 25% salt over their current weight. Subsequently, they were returned to the empty trays and were again stored until the end of the experiment under controlled temperature refrigeration at  $8^\circ\text{C} - 10^\circ\text{C}$ . The maximum salting time was pre-established at 30 days.

The remaining salt (not adhered to the feet) from the salting and salting process was used to cover the samples during the storage process. Creating a protective layer over the feet.

### 2.4. Sampling

Three samples were collected before the beginning of the process, being considered the control samples (AB), indicating the natural conditions of the pork feet without artificial contamination. Immediately after the pool inoculation, three samples called Inoculum Control (IC) were collected. After salting, a new collection of three samples was performed and called Salting Control (CS). After one, 24, and 96 hours of experiment, three new

samples were collected and counted for *Salmonella*. After this period, three samples were taken in intervals of two or 4 four days until the end of the experiment, as shown in Table 1.

*Salmonella* survival was evaluated in three different experiments, named experiment 1, which evaluated *Salmonella* survival from low inoculum, experiment 2 evaluating the survival of *Salmonella* from medium inoculum, while experiment 3 evaluating survival from high inoculum. Each experiment was repeated twice, and on each sampling day, three triplicates of samples were collected, one for each level of artificial contamination.

In experiment 1, the samples were analyzed for 18 days, as from this time on, the counts were undetectable (<10 CFU/g), and the qualitative tests (MDA) showed negative results (absence in 25g). Qualitative tests were performed only for *Salmonella*-negative samples on agar plates (see below). For experiments 2 and 3 the samples were analyzed for 30 days.

## 2.5. Microbiological analyzes

On each sampling day, pork feet samples were placed inside a laminar flow hood, and 25g of each pork foot was removed with the aid of a knife and sterile tweezers. Internal and external face portions of pork feet were sampled, diluted in a 1:10 ratio, adding 225 mL Buffered Peptone Water (APT, Merck, Darmstadt, Germany) to the 25g collected. Weighing and initial dilution were performed in Dilumat® equipment (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), and subsequent dilutions were performed using 9mL of 0.85% Peptone Saline Solution with the aid of an automatic micropipettor (Merck, Darmstadt, Germany).

Subsequently, the samples were submitted for enumeration of *Salmonella* spp. through direct plating, where 1mL of the dilutions were seeded on 90x15mm plates of Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) (Oxoid, Altrincham, England), and, in parallel, on Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green Agar (MLCB) (Oxoid Altrincham, England). Bacterial cells can be enumerated in 1 ml inoculation only when the counts are equal to or higher than 10 CFU/g.

The tests were performed in triplicate for each of the two-culture media (XLD and MLCB) used; that is, for every three samples, 18 results were obtained. The plates with characteristic colonies of *Salmonella* and the positive samples in the Absence/Presence method, were submitted to biochemical and serological confirmation, following ISO 6579:2021 method (ISO 6579-1 Microbiology of the Food Chain — Horizontal Method for the Detection, Enumeration and Serotyping of Salmonella — Part 1: Detection of Salmonella

Spp., 2017).

## 2.6. *Physical-chemical analysis*

On each sampling day, water activity( $a_w$ ) tests (ISO 18787: Foodstuffs — Determination of Water Activity - AW, 2017), salt content (Brasil. Ministério da Agricultura, 2022) and pH (ISO 2917: Meat and Meat Products. Measurement of the PH, 1999) were also carried out. These analyzes were performed in duplicate, using samples without *Salmonella* spp. contamination but subjected to the same salting process. To obtain a homogeneous meat mass, it was necessary deboning the feet, taking only the meat to the milling process, after which the physical-chemical analyzes were performed.

Initially, two duplicate samples were prepared without going through the salting process, being used as control samples. The results found in each analyzed parameter were considered as values naturally present in the analyzed products.

The sampling collections was carried out one hour after salting and later in: 1, 4, 6, 14, 16, 20, 22 and 30 days, resulting in 18 results per analyzed parameter. All tests were performed in duplicate, and the value presented in this work represents the mean between the two values found.

## 2.7. *Salmonella counts in pork feet contaminated during industrial process*

In order to quantify the *Salmonella* contamination of pork feet processed in the food industry, 13 boxes of pork feet positive for *Salmonella* spp. were subjected to quantitative analysis. From each box, 10 samples of pork feet were analyzed in triplicate by direct plating on MLCB agar and XLD agar.

## 2.8. *Statistical analyzes*

The results obtained in the microbiological experiments and physical-chemical parameters were statistically analyzed by the Minitab® software using ANOVA and Tukey's test at a 5% significance level.

## 3. Results

The microbial reduction data of the three experiments are presented in Table 1, where

the values represent the average of counting triplicates during the period of experiments, i.e. 18 days for the low inoculum and 30 days for the medium and high inoculum. Counts are presented in  $\log_{10}$  and separately for XLD and MLCB medium from artificial contamination with three different inoculum levels.

The samples with low inoculum result showed initial counts on XLD of  $2.91 \pm 0.05 \log_{10}$  CFU/g and on MLCB  $2.95 \pm 0.03 \log_{10}$  CFU/g. After the first 24 hours of salt exposure, there was a significant reduction in *Salmonella* spp. on both culture media; that is, the counts were reduced to  $1.16 \pm 0.19 \log_{10}$  CFU/g on XLD and  $1.51 \pm 0.22 \log_{10}$  CFU/g on MLCB. After a 7-days exposure, the samples no longer showed *Salmonella* spp. on plates but were still positive according to the qualitative method. Only after 18 salting days was it possible to obtain a negative result (Absent/25g) by the MDA method and confirmed by the traditional method, ISO 6579:2017 [6].

Pork feet inoculated with medium inoculum showed initial counts on XLD of  $5.92 \log_{10}$  CFU/g and on MLCB  $5.90 \log_{10}$  CFU/g. After the first 24 hours, there was a significant reduction of about 2 logs CFU/g, reaching values of  $4.74 \pm 0.47 \log_{10}$  CFU/g on XLD and  $4.90 \pm 0.28 \log_{10}$  CFU/g on MLCB. The decrease followed gradually until the 26th day of exposure to salt, when the counts reached  $<10$  CFU/g on both culture media. However, the results were positive for the MDA method until the 30th, the last day of testing.

High inoculum samples resulted in initial counts of  $8.14 \pm 0.12 \log_{10}$  on XLD and  $8.18 \pm 0.12 \log_{10}$  on MLCB. After the first 24 hours, there was a significant reduction of about 2  $\log_{10}$  CFU/g, reaching values of  $6.05 \pm 0.09 \log_{10}$  CFU/g on XLD and  $6.14 \pm 0.09 \log_{10}$  CFU/g on MLCB. Counts were very similar to the experiment with medium contamination, decreasing significantly after 24 hours and reducing to  $<10$  CFU/g after 26 days but remaining positive even on the last day of testing.

Among the 130 pork feet which come from *Salmonella*-positive batches, only 2.31% of them was possible to quantify this microorganism, and the counts were: sample 1: MLCB  $1.57 \log_{10}$  CFU/g and XLD  $1.56 \log_{10}$  CFU/g; sample 2:  $1.48 \log_{10}$  CFU/g for both media; and sample 3:  $1.53 \log_{10}$  CFU/g on MLCB and  $0.95 \log_{10}$  CFU/g on XLD.

In Table 1, it was possible to verify a significant difference between the counts on the two culture media used ( $P < 0,05$ ). In all collections, MLCB agar performed better, as it grows more colonies than XLD agar.

Physical-chemical results ( $a_w$ , pH and NaCl) showed a linear and very similar behavior between the experiments with the three inoculum levels (low, medium, and high), shown on Table 2.

The performance of the physical-chemical tests was similar in the three experiments.

The  $a_w$  results showed a statistically significant reduction in the first hour of exposure to salt ( $P < 0,05$ ), changing from  $0.996 \pm 0.001$  to  $0.765 \pm 0.009$  and presenting a new decrease in six days of the process, reaching  $0.755 \pm 0.001$ . After that,  $a_w$  maintained stable until the end of the experiment.

The pH results did not change significantly throughout the experiment, remaining at values from  $7.25 \pm 0.01$  to  $7.49 \pm 0.07$ .

As expected, NaCl showed a significant increase in the first hour of salting, rising from  $0.45\% \pm 0.06$  to  $17.90\% \pm 4.10$ . Then, the values remained stable, with no significant change at the end of the experiment, that is, day 18 for low level and day 30 for medium and high level.

#### 4. Discussion

The results of this study demonstrated significant reductions in *Salmonella* spp. population in artificially inoculated pork feet within 24 hours of exposure to salt. The same behavior was observed in the three evaluated inoculum levels. That is explained by the fact that this exposure to salt causes dehydration of the meat, reducing  $a_w$  and, consequently, the survival of *Salmonella* cells (Mol et al., 2010). The  $a_w$  values, initially of  $0.996 \pm 0.001$ , were reduced to  $0.765 \pm 0.009$  in the first 24 hours of salting. Similar conditions were observed by Suhendan et al. (2010) when salting mackerel-type fish. Sample groups A (salt/fish = 80/100) and B (salt/fish = 30/100) reached values of  $0.748 \pm 0.024$  and  $0.773 \pm 0.026$ , respectively in five days of salting.

In the present study, the maximum time of 30 days was not able to completely eliminate *Salmonella* spp. in experiments containing medium and high inoculum. However, after 26 days, there was a *Salmonella* reduction of approximately 6 and 8  $\log_{10}$  CFU/g, respectively. However, even without presenting microorganism counts on plates of XLD and MLCB culture media, both experiments maintained positive results in the qualitative method, indicating the presence of viable *Salmonella* spp., probably lower than the limit of the plate quantification methods, since the rapid method is capable of detecting 1 to 5 CFU/mL (Afnor, 2020).

The total inactivation of *Salmonella* spp. proved to be dependent on the inoculum size, indicating that the larger the population initially present in the sample, the longer the time required for its complete inactivation. On the other hand, the experiment with low

inoculum (approximately  $10^2$  CFU/g) took 18 days to be completely inactivated, showing negative results in the qualitative method and the absence of growth in the quantitative method.

*Salmonella* spp. are enteric bacteria responsible for salmonellosis, a severe disease whose clinical symptoms are diarrhea, vomiting, and, sometimes, fever that usually lasts for 3–5 days. Hospitalization may result in some cases, but sequelae and deaths are rare (Tondo & Gonçalves, 2021). Based on this, Brazilian food industries must follow microbiological requirements to guarantee the food safety of their products. For example, during the production process, swine slaughterhouses must carry out sampling cycles to test *Salmonella* spp. on carcasses with the objective of monitoring an expected prevalence of 12% or less. When these official cycles are violated, corrective and preventive measures must be taken to guarantee the safety of pork products (BRASIL, 2018). According to the Normative Instruction No. 161 (BRASIL, 2022), the microbiological standard of pork meat at the raw salted pork meat at the market is the absence of *Salmonella* in 5 samples. When these pork products deviate from microbiological standards, interventions can be used to eliminate the hazard. Many interventions are approved to treat these products worldwide, such as chemical interventions through the use of technology adjuvants that act as antimicrobials such as organic acids, chlorine (FAO/WHO, 2016a), oxidizers (FAO/WHO, 2016b) or physical processes such as the use of dry/ humid heat (EFSA, 2011; Pivotto et al., 2015), steam vacuuming, ultraviolet light, ionizing irradiation, high-pressure processing (FAO/WHO, 2016b) among other technologies, although in Brazil only thermal treatment is allowed for use and it should follow the binomial time-temperature of 71,1°C for 3 minutes or 72°C for 15 seconds (MAPA, 2022).

In the “Manual of verification and inspection procedures for meat and meat products in Brazilian establishments registered under the federal inspection service (SIF)”, it is mentioned that thermal treatment of positive batches for *Salmonella* should reduce from 6.5 to 7.0 logs (MAPA, 2022). In the present study, we verified similar *Salmonella* reductions through the applied salting process. We were also able to demonstrate through the results of analyzes carried out on samples from the industrial process, previously positive for *Salmonella*, that the contamination is much lower (maximum 1.57  $\log_{10}$  CFU/g) than the values indicated in the legislation. These results indicate that dry salting can be an interesting alternative to eliminate this microorganism in industrially processed pig feet since this condition was confirmed by the complete inactivation after 18 days of salting of pig feet with low *Salmonella* inoculum.

Some studies reported that the number of viable cells found in pork samples is less than 10 CFU/g, as is the case of the results presented by Evelyn et al. (Mann et al., 2014), where porcine ileocecal lymph nodes of 540 animals divided into 180 pools were evaluated. Only seven pools were positive in the qualitative method. Van Damme et al. (Van Damme et al., 2018) also studied the quantification of *Salmonella* spp. in a study conducted in slaughterhouses in Flanders, Belgium. The authors identified positivity in 30% of samples of rectal content of pork during slaughter, but no sample with a count higher than 10 CFU/g.

What may have contributed to the *Salmonella* population reduction is the fact that the samples were exposed to more than one stress condition, such as the low  $a_w$  demonstrated and the storage temperature, as the entire experiment was maintained at temperatures of 8°C - 10°C. Several studies demonstrate the difficulty for the microorganism to develop when subjected to two stress conditions, such as the one by Hoang et al. (Duc et al., 2018), who tested the combination of phages and low storage temperature to reduce *Salmonella* Typhimurium and *S. Enteritidis*. Roy et al. (Roy et al., 2021) demonstrated significant biofilm formation reduction on plastic, rubber, and chicken skin surfaces by *S. Kentucky* when the microorganism was subjected to lower temperatures (4°C), added to a pH condition lower than 4.0.

Regarding the two culture media used for *Salmonella* counting, it was possible to verify that the MLCB agar performs better in the recovery of *Salmonella* spp. compared to XLD. This condition is probably due to the composition of the media, as the XLD has only one primary source of energy (nutrient), the yeast extract. MLCB agar additionally has two other different sources of energy, namely: meat extract and enzymatic digestion of animal tissue. Both are important sources of nitrogen, vitamins, minerals, and amino acids, which can improve the agar's recovery of injured cells, as in the case of those exposed to salt.

#### **4. Conclusion**

The salting process was able to significantly decrease the *Salmonella* spp. count in pig feet already in the first 24 h. Even greater reductions were observed by the end of the experiments for the three levels of inoculum, in the case of feet inoculated with a low level of *Salmonella*, after 18 days of salting it was not possible to detect this microorganism in the quantitative and qualitative methods.

The two-culture media used were able to recover *Salmonella* spp. in a linear way and very similar to each other. However, the MLCB Agar presented higher counts than the XLD

Agar, indicating better recovery of Salmonella cells, mainly in the low and medium inoculum levels.

Considering that the levels of Salmonella found in swine feet contaminated in the industry were lower than the reductions transmitted by dry salting applied in this experiment, this process can be considered an attractive alternative to significantly reduce or completely eliminate Salmonella from swine feet.

### **CRedit authorship contribution statement**

**Rafaela Busnello:** Conceptualization, methodology, investigation, data curation, writing—original draft preparation, writing—review and editing. **Luisa Aneiros Gené:** investigation. **Mariane Ferreira Silva:** investigation. **Nathanyelle Soraya Martins de Aquino:** Conceptualization, writing—review and editing. **Eduardo Cesar Tondo:** Conceptualization, writing—review and editing, supervision.

### **Declaration of Competing Interest:**

The authors Rafaela Busnello, Luisa Gené and Mariane Ferreira Silva are company employees. The author Rafaela Busnello is a student and conducted the research that was carried out within the master's program at the Federal University of Rio Grande do Sul. The company that provided the facilities (laboratory structure, material, sample and editorials) is a for-profit institution, but the article does not represent a conflict of interest for the company, as it is the result of encouraging applied research to its employees. The company was not involved in the study design, collections, laboratory analysis, interpretation of data obtained, writing of this article or in the decision to submit it for publication. The authors declare that the research was carried out in the absence of any commercial or financial relationship that could be interpreted as a potential conflict of interest.

**Data Availability Statement:** The data that supported the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

### **References**

Afnor. (2020). Molecular Detection Assay 2- *Salmonella*. *Afnor Certification*, 33(33), 1–52.

[https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/salmonella-spp/attachment/3m-01-16-11-16\\_en/](https://nf-validation.afnor.org/en/food-industry/salmonella-spp/attachment/3m-01-16-11-16_en/)

- Binici, A., & Kurt Kaya, G. (2018). Effect of brine and dry salting methods on the physicochemical and microbial quality of chub (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758). *Food Science and Technology (Brazil)*, 38, 66–70. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.15717>
- BRASIL. (2018). INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 60, DE 20 DE DEZEMBRO DE 2018. In *Diário Oficial da União* (IN 60). Diário Oficial da União. [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/56641896](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/56641896)
- BRASIL. (2022). Instrução Normativa Nº 161, de 1º de julho DE 2022. In *Diário Oficial da União* (IN 161). Diário Oficial da União. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880>
- Brasil. Ministério da Agricultura, P. e A. (2022). *Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal* (Método 5.6). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)
- Chabbouh, M., Ben Hadj Ahmed, S., Farhat, A., Sahli, A., & Bellagha, S. (2012). Studies on the Salting Step of Tunisian Kaddid Meat: Experimental Kinetics, Modeling and Quality. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1882–1895. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0635-2>
- Duc, H. M., Son, H. M., Honjoh, K. ichi, & Miyamoto, T. (2018). Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *LWT*, 91, 353–360. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.01.072>
- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). *EFSA Journal*, 9(10), 2351. <https://doi.org/https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2351>
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. (2016a). *Guidelines for the control of nontyphoidal Salmonella spp. in beef and pork meat*. [http://www.fao.org/docrep/012/i1134e/i1134e00.htm%0Ahttp://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BGL%2B87-2016%252FCXG\\_087e.pdf](http://www.fao.org/docrep/012/i1134e/i1134e00.htm%0Ahttp://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCAC%2BGL%2B87-2016%252FCXG_087e.pdf)
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. (2016b). Interventions for the Control of Non-typhoidal Salmonella spp. in Beef and Pork. MEETING REPORT AND SYSTEMATIC REVIEW. In *Meeting report and systematic review. Microbiological Risk Assessment Series No. 30*. [www.fao.org/food/food-safety-quality](http://www.fao.org/food/food-safety-quality)
- Forsythe, S. J. (2013). *Microbiologia da segurança dos alimentos* (2nd editio). Artmed.
- ISO 18787: Foodstuffs — Determination of water activity - AW, 10 (2017). <https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/11546/abnt-nbriso18787-produtos-alimenticios-determinacao-da-atividade-de-agua>

- ISO 6579-1 Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp., 50 (2017).
- ISO 2917: Meat and meat products. Measurement of the pH, 6 (1999).
- Mann, E., Wagner, M., Schmoll, F., Slaghuis, J., Schönenbrücher, H., & Mester, P. (2014). Rapid testing and quantification of *Salmonella* in ileocaecal lymph nodes of Austrian pigs slaughtered for consumption. *Research in Veterinary Science*, 97(2), 187–190. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2014.06.016>
- MAPA. (2022). *Carnes: Manual de procedimentos de inspeção e fiscalização de carnes e produtos cárneos em estabelecimentos registrados sob inspeção federal (SIF)*. Secretaria de Defesa Agropecuária. [https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Inspeção-Animal/manual\\_produtos\\_carneos](https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Inspeção-Animal/manual_produtos_carneos)
- Mol, S., Cosansu, S., Ucok Alakavuk, D., & Ozturan, S. (2010). Survival of *Salmonella* Enteritidis during salting and drying of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1–2), 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.01.046>
- Pivotto, M., Dutra, A. P., Brizio, R., & César De Castro, L. (2015). 54 Redução na contaminação superficial de carcaças suínas: um processo alternativo. In *Revista de Agricultura v* (Vol. 90, Issue 1).
- Roy, P. K., Ha, A. J. W., Mizan, M. F. R., Hossain, M. I., Ashrafudoulla, M., Toushik, S. H., Nahar, S., Kim, Y. K., & Ha, S. Do. (2021). Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella* enterica serotype Kentucky and virulence gene expression. *Poultry Science*, 100(7), 101209. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2021.101209>
- Sammanee, P., Ngamsanga, P., Jainonthee, C., Chupia, V., Sawangrat, C., Kerdjana, W., Lampang, K. N., Meeyam, T., & Pichpol, D. (2022). Decontamination of Pathogenic and Spoilage Bacteria on Pork and Chicken Meat by Liquid Plasma Immersion. *Foods*, 11(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/foods11121743>
- Simons, R. R. L., Hill, A. A., Swart, A., Kelly, L., & Snary, E. L. (2016). A Transport and Lairage Model for *Salmonella* Transmission Between Pigs Applicable to EU Member States. *Risk Analysis*, 36(3), 482–497. <https://doi.org/10.1111/risa.12390>
- Tondo, E. C., & Gonçalves, C. T. H. (2021). Using Risk–Benefit Analysis to Control *Salmonella* in Chicken Meat. *Food Quality and Safety*, 5, fyab027. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyab027>
- Van Damme, I., Mattheus, W., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2018). Quantification of hygiene indicators and *Salmonella* in the tonsils, oral cavity and rectal content samples of pigs during slaughter. *Food Microbiology*, 71, 120–128. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2017.03.012>



**Table 1.** *Salmonella* spp. survival on pork feet subjected to dry salting for 18 and 30 days.

Time	LOW INOCULUM			MEDIUM INOCULUM			HIGH INOCULUM		
	Salmonella count (Log <sub>10</sub> +/- SD)		MDA <sup>1</sup>	Salmonella count (Log <sub>10</sub> +/- SD)		MDA	Salmonella count (Log <sub>10</sub> +/- SD)		MDA
	XLD	MLCB	A <sup>2</sup> /P <sup>3</sup>	XLD	MLCB	A/P	XLD	MLCB	A/P
<b>CI<sup>4</sup></b>	2,91 ± 0,05 <sup>A; B</sup>	2,95 ± 0,03 <sup>A; A</sup>	ND <sup>5</sup>	5,92 ± 0,15 <sup>A; A</sup>	5,90 ± 0,18 <sup>A; A</sup>	ND	8,14 ± 0,12 <sup>A; A</sup>	8,18 ± 0,12 <sup>A; A</sup>	ND
<b>IS<sup>6</sup></b>	2,90 ± 0,06 <sup>A; B</sup>	2,92 ± 0,05 <sup>A; A</sup>	ND	5,85 ± 0,24 <sup>A; A</sup>	5,87 ± 0,20 <sup>A; A</sup>	ND	8,10 ± 0,11 <sup>A; A</sup>	8,11 ± 0,11 <sup>A; A</sup>	ND
<b>1H</b>	1,30 ± 0,27 <sup>B; B</sup>	1,61 ± 0,26 <sup>B; A</sup>	P	4,74 ± 0,47 <sup>B; B</sup>	4,90 ± 0,28 <sup>B; A</sup>	ND	7,03 ± 0,12 <sup>B; A</sup>	7,03 ± 0,03 <sup>B; A</sup>	ND
<b>1D</b>	1,16 ± 0,19 <sup>C; B</sup>	1,51 ± 0,22 <sup>C; A</sup>	P	3,94 ± 0,23 <sup>C; A</sup>	4,13 ± 0,30 <sup>C; A</sup>	ND	6,05 ± 0,09 <sup>C; B</sup>	6,14 ± 0,09 <sup>C; A</sup>	ND
<b>4D</b>	NR	NR	ND	3,78 ± 0,32 <sup>C; B</sup>	4,28 ± 0,12 <sup>C; A</sup>	ND	5,94 ± 0,06 <sup>C; B</sup>	6,03 ± 0,05 <sup>D; A</sup>	ND
<b>6D</b>	1,00 ± 0,09 <sup>C; A</sup>	0,98 ± 0,06 <sup>D; A</sup>	P	3,21 ± 0,25 <sup>D; B</sup>	3,84 ± 0,22 <sup>C; A</sup>	ND	5,44 ± 0,23 <sup>D; B</sup>	5,76 ± 0,11 <sup>E; A</sup>	ND
<b>8D</b>	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	P	2,54 ± 0,53 <sup>E; A</sup>	2,87 ± 0,57 <sup>D; A</sup>	ND	5,24 ± 0,23 <sup>E; A</sup>	5,31 ± 0,22 <sup>F; A</sup>	ND
<b>12D</b>	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	P	2,13 ± 0,94 <sup>F; A</sup>	2,36 ± 1,08 <sup>E; A</sup>	ND	5,17 ± 0,03 <sup>E; B</sup>	5,28 ± 0,05 <sup>F; A</sup>	ND
<b>14D</b>	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	P	0,95 ± 0,02 <sup>G; B</sup>	2,23 ± 0,83 <sup>E; A</sup>	ND	4,98 ± 0,05 <sup>F; B</sup>	5,02 ± 0,03 <sup>G; A</sup>	ND
<b>16D</b>	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	P	2,13 ± 0,23 <sup>F; A</sup>	2,07 ± 0,72 <sup>E; A</sup>	ND	4,73 ± 0,04 <sup>G; B</sup>	4,85 ± 0,05 <sup>H; A</sup>	ND
<b>18D</b>	0,95 ± 0,00 <sup>C; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>D; A</sup>	A	1,11 ± 0,23 <sup>G; B</sup>	1,80 ± 0,50 <sup>F; A</sup>	ND	4,13 ± 0,05 <sup>H; B</sup>	4,35 ± 0,06 <sup>I; A</sup>	ND
<b>20D</b>	ND	ND	ND	0,95 ± 0,28 <sup>G; B</sup>	1,58 ± 0,55 <sup>G; A</sup>	P	4,06 ± 0,03 <sup>H; B</sup>	4,15 ± 0,03 <sup>J; A</sup>	ND
<b>22D</b>	ND	ND	ND	0,95 ± 0,00 <sup>G; B</sup>	1,48 ± 0,61 <sup>G; A</sup>	P	4,01 ± 0,03 <sup>H; B</sup>	4,08 ± 0,06 <sup>J; A</sup>	ND
<b>24D</b>	ND	ND	ND	0,95 ± 0,00 <sup>G; B</sup>	1,39 ± 0,43 <sup>G; A</sup>	P	1,59 ± 0,10 <sup>I; B</sup>	2,00 ± 0,09 <sup>K; A</sup>	ND
<b>26D</b>	ND	ND	ND	0,95± 0,00 <sup>H; A</sup>	0,95± 0,00 <sup>H; A</sup>	P	0,95 ± 0,00 <sup>J; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>L; A</sup>	P
<b>28D</b>	ND	ND	ND	0,95± 0,00 <sup>H; A</sup>	0,95± 0,00 <sup>H; A</sup>	P	0,95 ± 0,00 <sup>J; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>L; A</sup>	P
<b>30D</b>	ND	ND	ND	0,95± 0,00 <sup>H; A</sup>	0,95± 0,00 <sup>H; A</sup>	P	0,95 ± 0,00 <sup>J; A</sup>	0,95 ± 0,00 <sup>L; A</sup>	P

<sup>1</sup>MDA: 3M™ Molecular Detection Assay 2; <sup>2</sup>A: Absent; <sup>3</sup>P: Positive, <sup>4</sup>CI: immediately after contamination, <sup>5</sup>ND: Not Done, <sup>6</sup>IS: Immediately after salting. For the first superscript, different letters indicate significant differences between collection times, with a significance of 5% between analysis methods. For the second superscript, different letters demonstrated statistical differences at the 5% significance level between the analysis methods. The results presented as 0.95 ± 0.00 are results lower than the method's limit (<10 CFU/g)/, therefore they were informed as 9 CFU to allow the statistical treatment.

**Table 2.** Results of Physical-Chemical parameters in pork feet subjected to dry salting for 30 days.

Time collect	LOW INOCULUM			MEDIUM INOCULUM			HIGH INOCULUM		
	aw <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	NaCl (%) <sup>3</sup>	aw	pH	NaCl (%)	aw	pH	NaCl (%)
<b>CS<sup>4</sup></b>	0.996±0.001 <sup>A</sup>	7.25±0.01 <sup>A</sup>	0.45±0.06 <sup>B</sup>	0.996±0.001 <sup>A</sup>	7.25±0.01 <sup>A</sup>	0.45±0.06 <sup>B</sup>	0.996±0.001 <sup>A</sup>	7.25±0.01 <sup>A</sup>	0.45±0.06 <sup>B</sup>
<b>1H</b>	0.765±0.009 <sup>B</sup>	7.40±0.16 <sup>A</sup>	17.90±4.10 <sup>A</sup>	0.765±0.009 <sup>B</sup>	7.40±0.16 <sup>A</sup>	17.90±4.10 <sup>A</sup>	0.765±0.009 <sup>B</sup>	7.40±0.16 <sup>A</sup>	17.90±4.10 <sup>A</sup>
<b>1D</b>	0.760±0.009 <sup>B</sup>	7.38±0.16 <sup>A</sup>	17.67±3.78 <sup>A</sup>	0.765±0.009 <sup>B</sup>	7.38±0.16 <sup>A</sup>	17.82±3.98 <sup>A</sup>	0.762±0.008 <sup>B</sup>	7.41±0.16 <sup>A</sup>	17.87±4.00 <sup>A</sup>
<b>4D</b>	0.758±0.005 <sup>B,C</sup>	7.31±0.17 <sup>A</sup>	15.58±1.88 <sup>A</sup>	0.758±0.005 <sup>B, C</sup>	7.35±0.17 <sup>A</sup>	15.58±1.88 <sup>A</sup>	0.758±0.005 <sup>B, C</sup>	7.31±0.17 <sup>A</sup>	15.58±1.88 <sup>A</sup>
<b>6D</b>	0.755±0.001 <sup>C</sup>	7.34±0.02 <sup>A</sup>	15.30±0.69 <sup>A</sup>	0.755±0.004 <sup>C</sup>	7.34±0.02 <sup>A</sup>	15.30±0.69 <sup>A</sup>	0.755±0.004 <sup>C</sup>	7.34±0.02 <sup>A</sup>	15.30±0.69 <sup>A</sup>
<b>14D</b>	0.753±0.002 <sup>C</sup>	7.47±0.23 <sup>A</sup>	18.48±1.71 <sup>A</sup>	0.753±0.002 <sup>C</sup>	7.47±0.23 <sup>A</sup>	18.48±1.71 <sup>A</sup>	0.753±0.002 <sup>C</sup>	7.46±0.23 <sup>A</sup>	18.48±1.71 <sup>A</sup>
<b>16D</b>	0.754±0.003 <sup>C</sup>	7.44±0.17 <sup>A</sup>	18.85±0.73 <sup>A</sup>	0.754±0.003 <sup>C</sup>	7.44±0.17 <sup>A</sup>	18.85±0.73 <sup>A</sup>	0.754±0.003 <sup>C</sup>	7.44±0.18 <sup>A</sup>	18.85±0.73 <sup>A</sup>
<b>18D</b>	0.755±0.001 <sup>C</sup>	7.41±0.16 <sup>A</sup>	18.75±0.47 <sup>A</sup>	ND <sup>5</sup>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>20D</b>	ND	ND	ND	0.755±0.000 <sup>C</sup>	7.41±0.16 <sup>A</sup>	16.75±2.37 <sup>A</sup>	0.755±0.000 <sup>C</sup>	7.41±0.16 <sup>A</sup>	16.75±2.37 <sup>A</sup>
<b>22D</b>	ND	ND	ND	0.755±0.000 <sup>C</sup>	7.38±0.19 <sup>A</sup>	16.02±1.54 <sup>A</sup>	0.755±0.000 <sup>C</sup>	7.38±0.19 <sup>A</sup>	16.02±1.54 <sup>A</sup>
<b>30D</b>	ND	ND	ND	0.753±0.002 <sup>C</sup>	7.49±0.07 <sup>A</sup>	19.43±0.83 <sup>A</sup>	0.753±0.002 <sup>C</sup>	7.49±0.07 <sup>A</sup>	19.43±0.83 <sup>A</sup>

aw<sup>1</sup>: Water activity; pH<sup>2</sup>: Potential of Hydrogen; NaCl<sup>3</sup>: Salt Content; CS<sup>4</sup>: Control Sample, ND<sup>5</sup>: Not detected. The results presented are the average between the repetitions. Different letters on the same line indicate significant differences between collection times with 5% significance.