



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Daniela Torquato Mengarda Buosi

**LUZ PULSADA PARA INATIVAÇÃO DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA*
ENTERICA EM MEIO DE CULTURA E PEITO DE FRANGO**

FLORIANÓPOLIS

2021

Daniela Torquato Mengarda Buosi

**LUZ PULSADA PARA INATIVAÇÃO DE SOROTIPOS DE *SALMONELLA*
ENTERICA EM MEIO DE CULTURA E PEITO DE FRANGO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos da Universidade Federal
de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Coorientadores: Dra. Carmen I. Moraru

Dra. Jaqueline Oliveira de Moraes

FLORIANÓPOLIS

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Buosi, Daniela Torquato Mengarda
LUZ PULSADA PARA INATIVAÇÃO DE SOROTIPOS DE SALMONELLA
ENTERICA EM MEIO DE CULTURA E PEITO DE FRANGO / Daniela
Torquato Mengarda Buosi ; orientador, Prof. Dr. Bruno
Augusto Mattar Carciofi, coorientador, Dra. Carmen I.
Moraru , coorientador, Dra. Jaqueline Oliveira de Moraes,
2021.

110 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Luz pulsada. 3.
descontaminação microbiológica. 4. Salmonella. 5. peito de
frango. I. Carciofi, Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar . II.
Moraru , Dra. Carmen I. . III. de Moraes, Dra. Jaqueline
Oliveira IV. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V.
Título.

Daniela Torquato Mengarda Buosi

**LUZ PULSADA PARA INATIVAÇÃO DE SOROTIPOS DE SALMONELLA
ENTERICA EM MEIO DE CULTURA E PEITO DE FRANGO**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof(a). Dr(a). Bruno Augusto Mattar Carciofi - Presidente UFSC

Prof(a). Dr(a). Francieli Dalcanton - Membro externo UNOCHAPECO

Prof(a). Dr(a). Katia Rezzadori - Membro externo CCA - UFSC

Prof(a). Dr(a). João Borges Laurindo - Membro interno UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutora em Engenharia de Alimentos.

Profa. Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira

Coordenadora do Programa

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Orientador

Florianópolis, 2021.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existência. Não se pode deixar de ficar admirado quando contempla os mistérios da eternidade, da vida, da maravilhosa estrutura da realidade.

Basta que se busque compreender um pouco desse mistério a cada dia.

Nunca perca a curiosidade... não pare de se maravilhar.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Um dia, cheguei a dizer que quando essa hora chegasse, iria agradecer a “Eu, a mim e a mim mesma”, pois o desafio dos 4 anos de doutorado foi algo realmente “não mensurável”. Eu disse, para mim mesma e para várias pessoas próximas a mim, que eu iria fazer o doutorado num tema que pudesse trazer a aplicação na indústria, e que iria fazer o doutorado sanduíche com parte deste desafio. Era realmente isso que eu queria, desse jeito, sem tirar “nem por” mais nada. Sei que não se faz nada sozinha, e que sim tenho muito a agradecer e irei fazer. Porém, nada supera o meu protagonismo dessa caminhada, com provas de “fogo” que nem eu sabia que seria capaz de encarar. Nesses 04 anos, muita coisa em nossas vidas mudou, não me torno apenas “Doutora” neste momento, mas mudei com certeza o patamar de nossas vidas.

Agradeço a Deus, pela vida e pela saúde. Saúde, a minha e principalmente, da minha família, que tornou possível toda esta caminhada. Todas as viagens, toda quilometragem dentro e fora do Brasil, e todas as horas de estudo em meio à rotina de filhos, marido, trabalho e vida social. Toda energia a mim dispensada para as horas de estudo, escrita, revisão, trabalho e experimentos.

Agradeço muito à minha família. Aos meus três filhos, minha filha mais velha e super responsável Maria Carolina, Ana Beatriz e João Augusto, que por muitas vezes não entenderam a minha ausência no dia a dia, e ficavam em dúvida se a mãe era aluna ou professora ou trabalhava. Ao Ricardo, marido, parceiro em me apoiar a sempre estudar e trabalhar, sendo, pai e mãe na minha ausência. Aos meus pais, meu pai Mengarda e minha mãe Sílvia, que além de tudo, me buscaram e me levaram e em todas às minhas aulas, acordando cedo e indo dormir tarde para me fazer companhia no aeroporto, nos dias que estava em Florianópolis. A minha irmã, Tata, que tanto me ouve e entende, que além de tudo me ajuda na correção dos textos e me prestigia nas apresentações. Ao meu irmão, Camilo, por todo o apoio e horas de distração (necessárias) e à cunhada Ju pelos vinhos, pizza, sushi e roupas emprestadas.

Ao meu orientador professor Bruno pela confiança e oportunidade, pelos inúmeros ensinamentos, anos de amizade e por toda contribuição e dedicação ao trabalho. Obrigada por me apoiar e me aceitar nesta caminhada, sendo um caminho tão desconhecido e desafiador para mim, tecnicamente e profissionalmente.

Aos meus coorientadores, Jaqueline, por todo apoio, e pela confiança, reconhecimento dos meus esforços, oportunidades e contribuição para o desenvolvimento desta tese e dos artigos. A Dra. Carmen I. Moraru, coorientadora por me receber na Universidade de Cornell, no laboratório de Food Science, em Ithaca NY (EUA), e coorientar e discutir o projeto com tanto entusiasmo. Ao Yifan Cheng e Rachel Alessandra Cheng, também Universidade de Cornell por toda paciência em me ensinar, toda oportunidade de aprender com eles, todo apoio e contribuição para o desenvolvimento desta tese e dos artigos.

À CAPES pelo apoio financeiro no Programa Doutorado Sanduíche no exterior (PDSE). À Universidade de Cornell, departamento de Food Science, que fez parte de todo meu processo de formação e crescimento profissional. À UFSC e ao PPGEAL pela oportunidade. Aos professores do PPGEAL pelos ensinamentos. Aos demais laboratórios e funcionários da UFSC pela disponibilidade e suporte técnico. Aos professores do programa de Pós-Graduação da UFSC, em especial ao João Borges Laurindo, Marco Di Luccio e Marcelo Lanza, e à Gláucia Maria Falcão de Aragão e Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz. Agradeço também ao Fernando, da secretaria PPGEAL, por toda atenção aos meus e-mails e pedidos via telefone a cada trimestre.

Às minhas amigas e amigos, Daniela, Daiane, Carolina, Makelli, Lisane, Natália, Luciana, Cleidiane, Fernanda, Olessandra, Rubiele, Simone, Suzana, Alexandre, Cícero, Marcel, Reginaldo, Leonardo, Sérgio, Ricardo, e tantas outras e outros, por me ouvirem explicar tantas vezes sobre esse meu estudo que envolvia microbiologia, bactéria, frango, luz pulsada, *Salmonella*, e mesmo sem entender nada, achar legal e serem sempre um apoio e uma amizade incondicional. Aos meus colegas da Universidade de Cornell, do laboratório de Food Science Pedro, Andreaa, Shaun, Hanyu, Alexandra e os amigos de Ithaca (NY), Cintia, Renato, Lorena, Waléria, que me apoiaram muitíssimo na empreitada no exterior, nos almoços e trajetos de ônibus na neve. Aos meus colegas da UFSC, Cintia, Wiaslan, Paula, Denise, Emanuele, Giustino e Natiele.

Ao pessoal da BRF, todos muito importantes, cada de um do seu jeito, numa parcela, mas todos numa contribuição sempre positiva. Por possibilitar este estudo cedendo as amostras, e acreditar que podemos fazer diferente. Aos meus colegas de trabalho de ontem, hoje e amanhã, que compartilham comigo as ansiedades, piadas, muitas horas sem dormir e muito suor.

Agradeço a todas as pessoas que sempre me apoiam e mesmo assim me desafiam, mesmo eu achando que não consigo tudo 100% e me contento com os resultados obtidos na

minha vida pessoal, profissional e espiritual. A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A contaminação por *Salmonella* em carne de frango desafia e motiva estudos para novas tecnologias que garantam a inocuidade do alimento bem como o seu frescor. Uma alternativa é a Luz Pulsada (LP) de alta intensidade e curta duração, um tratamento não-térmico capaz de inativar micro-organismos em líquidos e superfícies sólidas. Neste estudo avaliou-se a inativação de diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg e Minnesota) com LP, variando o comprimento de pulso e a tensão elétrica aplicada à lâmpada para descontaminação da superfície do meio de cultura e da carne de peito de frango. O meio de cultura inoculado com 10^8 UFC/cm² dos sorotipos de *Salmonella* foi exposto à LP com pulsos de 50 a 420 μ s usando 2000, 2500 e 3000 V. A taxa de inativação pela LP aumentou de 3 para 6 log quando a tensão aumentou de 2000 para 3000 V, mantendo um nível de fluência semelhante em torno de 191-198 mJ / cm² para *S. Typhimurium* no meio de cultura. No geral, a inativação de *Salmonella* em meio de cultura, atingiu uma redução de até 6 a 7 logs para os quatro sorotipos e a mistura de coquetel após apenas um único pulso de luz com uma fluência de 280 mJ / cm². O tratamento do filé de peito de frango foi aplicado às duas superfícies do filé de peito de frango (superfície externa da carcaça e parte ligada ao dorso) inoculados com 10^6 UFC/cm² do coquetel de sorotipos de *Salmonella enterica*. A redução da contaminação bacteriana foi avaliada conforme a quantidade de pulsos (1 a 6 pulsos) e a duração dos pulsos (de 420 a 2520 μ s), atingindo a fluência máxima de 12,72 J/cm². O filé de peito de frango tratado foi também avaliado quanto ao aumento de temperatura ao final do tratamento por LP e caracterizado quanto à cor instrumental e os atributos sensoriais. Ainda, o filé de peito de frango foi testado quanto à sobrevivência da *Salmonella* quando a LP foi aplicada ao produto embalado e congelado. A inativação dos sorotipos de *Salmonella enterica* em superfícies de peito de frango resfriados variaram, no intervalo de parâmetros estudados, de 1,18 a 2,33 log na superfície externa e de 0,58 a 1,17 log na superfície inferior, valores significativamente menores que os observados para a superfície, lisa e não poroso, e ainda muito inferiores aos valores obtidos nos experimentos realizados em meio de cultura. A descontaminação do peito de frango foi dependente significativamente da topografia da superfície exposta à LP. No entanto, a inativação não foi significativamente dependente da duração e do número de pulsos para uma mesma superfície. Os atributos de qualidade, cor e avaliação sensorial, não indicaram alterações da carne tratada quando comparada às amostras não tratadas pela LP. Ainda, o congelamento não alterou o efeito da inativação de *Salmonella* quando comparado ao tratamento da carne resfriada. Os resultados mostraram que a LP pode ser aplicada dentro do limite sugerido na literatura e órgãos reguladores (12 J/cm²) para a inativação de diferentes sorovares de *Salmonella enterica* sem alterações sensoriais do filé de peito de frango. Como conclusões, os tratamentos de LP conduzidos sob fluência semelhante, mas em diferentes voltagens e irradiâncias, resultaram em diferentes níveis de inativação microbiana em meio de cultura e peito de frango. Além disso, os resultados demonstraram valores de redução logarítmica não significativamente diferentes para cada sorotipo e o coquetel. Porém, foi observado em um nível de fluência intermediário, que o sorotipo *S. Enteritidis* apresentou uma redução de 1 log maior do que outros sorotipos. No entanto, o uso de um coquetel de sorotipos de *Salmonella enterica* para delinear o tratamento LP é adequado, uma vez que a mistura acompanhou os sorotipos mais resistentes. Essas descobertas sugerem que é viável e eficaz ajustar a tensão, o comprimento do pulso e a fluência, de modo que uma inativação mais eficaz de bactérias possa ser alcançada com a tecnologia de LP, mantendo a qualidade do produto e economizando energia, abrindo assim novas possibilidades para otimizar o tratamento para uma dada aplicação industrial. Para a seleção do tratamento de LP, como uma intervenção ao controle de *Salmonella* em peito de frango, é possível concluir que a superfície exposta ao tratamento por LP e a fluência aplicada devem ser considerados como parâmetros relevantes.

Palavras-chave: tratamento não-térmico; inativação microbiana; luz pulsada; *Salmonella*; filé de peito de frango.

ABSTRACT

The contamination by *Salmonella* in chicken meat challenges and motivates studies for new technologies that ensure the food safety, as well as its freshness. An alternative is Pulsed Light (PL) of high intensity and short duration, a non-thermal treatment capable of inactivating microorganisms in liquids and solid surfaces. In this study, the inactivation of serotypes of *Salmonella enterica subsp. enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg and Minnesota) with PL, varying the pulse width and voltage applied to the lamp for surface decontamination of agar media surface and chicken breast meat. Agar media surface inoculated with 10^8 CFU/cm² of the *Salmonella* serotypes was exposed to PL with pulses from 50 to 420 μ s using 2000, 2500 and 3000 V. The inactivation rate by PL increased from 3 to 6 log when the voltage increased from 2000 to 3000 V, keeping a similar fluence level around 191-198 mJ/cm² for *S. Typhimurium* in the agar media. Overall, *Salmonella* inactivation in agar media reached a reduction up to 6 to 7 logs for the four serotypes and the cocktail mixture after just one single light pulse with a fluence of 280 mJ /cm². The chicken breast fillet treatment was applied to the two surfaces of the chicken breast fillet ((top and bottom surfaces) inoculated with 10^6 CFU/cm² of the *Salmonella enterica* serotype cocktail. The reduction of bacterial contamination was evaluated according to the number of pulses (1 to 6 pulses) and pulse width (from 420 to 2520 μ s), reaching a maximum fluence of 12.72 J/cm². The treated chicken breast fillet was also evaluated for temperature increase after PL treatment and instrumental color and sensory attributes. In addition, chicken breast fillet was tested for *Salmonella* survival when PL was applied to the packaged and frozen product. The inactivation of *Salmonella enterica* serotypes on fresh chicken breast surfaces varied, in the range of parameters studied, from 1.18 to 2.33 log on the top surface and from 0.58 to 1.17 log on the bottom surface, values significantly smaller than those observed for the surface, smooth and non-porous, and still much lower than the values obtained in the experiments carried out in agar media surface. Chicken breast decontamination was significantly dependent on the topography of the surface exposed to PL. However, inactivation was not significantly dependent on the pulse width and number of pulses for the same surface. The attributes of quality, color and sensory evaluation did not indicate changes in the treated meat when compared to samples not treated by PL. Also, freezing did not change the effect of *Salmonella* inactivation when compared to the treatment of fresh meat. The results showed that PL can be applied within the limit suggested in the literature and regulatory rules (12 J/cm²) for the inactivation of different serovars of *Salmonella enterica* without sensory changes impacts in chicken breast fillet. As conclusions we can mention that the PL conducted under similar fluence, but at different voltages and irradiance, resulted in different levels of microbial inactivation in agar media and chicken breast meat. Furthermore, the results showed non-significantly different log reduction values for each serotype and cocktail. However, at an intermediate fluence level, serotype *S. Enteritidis* showed a reduction of 1 log greater than other serotypes. However, the use of a cocktail of *Salmonella enterica* serotypes to delineate PL treatment is adequate, as the mixture followed the more resistant serotypes. These findings suggest that it is feasible and effective to adjust voltage, pulse width and fluence level so that more effective bacterial inactivation can be achieved with PL technology, keeping the product quality, and saving energy, thus opening new one's possibilities to optimize the treatment for a given industrial application. For PL treatment selection, as an intervention to *Salmonella* control in chicken process, it is possible to conclude that the surface exposed to the PL treatment and the fluence level should be considered as relevant parameters.

Keywords: non-thermal treatment; microbial inactivation; pulsed light; *Salmonella*; chicken breast fillet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Figura esquemática que ilustra as faixas de comprimento de onda para radiação ionizante e não ionizante.	28
Figura 2.2. Figura esquemática que ilustra as ações de reflexão, transmissão, difusão e absorção de luz.	30
Figura 2.3. Representação Esquemática - unidade experimental de luz pulsada.	32
Figura 2.4. Imagem (fotomicrografia eletrônica) de <i>Salmonella</i> spp.	42
Figura 2.5. Fluxograma das principais etapas de processamento de frangos.	50
Figura 2.6. Localização anatômica do peito de frango: músculo <i>Pectoralis Major</i>	55
(1), supracoracoideus (2), úmero (3), esterno (4) e clavícula (5).	55
Figura 2.7. Imagens peito de frango e as diferentes formas de apresentação.	56
Figure 3.1. Schematic diagram of the PL unit with a treatment chamber and the power supply energizing a xenon lamp.	63
Figure 3.2. PL fluence as a function of pulse width at 2000 V (Δ), 2500 V (\square), and 3000 V (\circ), and the respective linear regression for each data set.	67
Figure 3.3. <i>S. Typhimurium</i> inactivation ($\log N/N_0$) as a function of applied PL fluence (mJ/cm^2) at 2000 V (Δ), 2500 V (\square), and 3000 V (\circ).	69
Figure 3.4. Experimental data and fitted Weibull model for the <i>S. Typhimurium</i> inactivation ($\log N/N_0$) as a function of applied PL fluence (mJ/cm^2) at 2000 V (Δ).	70
Figure 4.1. Chicken breast fillets images of (a) top side surface and (b) bottom side surface, and chicken breast fillets cut samples of the (c) top side surface and (d) bottom side surface.	77
Figure 4.2. Confocal microscopy images (a) agar media surface, (b) chicken breast top surface and (c) chicken breast bottom surface.	85
Figure 4.3. Confocal microscopy images of PL-treated (6 pulses of 420 μs at 3000 V and total of 12.26 J/cm^2) chicken breast: (a) superior view of the top surface, (b) superior view of the bottom surface, (c) three-dimensional view of the top surface, and (d) three-dimensional of the bottom surface. Chicken nuclei protein was marked as red (bigger than 10 μm), and <i>Salmonella</i> cells alive in green and dead in red (smaller than 10 μm).	86
Figure 5.1. Chicken breast fillet sample in transparent plastic PE bag	95

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1. TECNOLOGIAS NÃO-TÉRMICAS BASEADAS EM RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA. -----	27
TABELA 2.2. CARACTERÍSTICAS DA LUZ UV. -----	29
TABELA 2.3 LUZ UV E LUZ PULSADA APLICADAS EM CARNE DE FRANGO. -----	40
TABELA 2.5. PARÂMETROS AMBIENTAIS E DE LETALIDADE TÉRMICA DA <i>SALMONELLA</i> . -----	45
TABLE 3.1. PL PARAMETERS VOLTAGE AND PULSE WIDTH AND THE RESULTING FLUENCE AND IRRADIANCE. -----	66
TABLE 3.2. <i>S. ENTERICA</i> SEROTYPES INACTIVATION AS A FUNCTION OF PL TREATMENT VOLTAGE, PULSE WIDTH, AND FLUENCE (MJ/CM ²). VALUES ARE AVERAGES ± ONE STANDARD DEVIATION (N = 3).-----	71
TABLE 4.1. FLUENCE DELIVERED, TEMPERATURE VARIATION (AVERAGE ± STANDARD DEVIATION), AND <i>SALMONELLA</i> LOG-REDUCTION (AVERAGE ± STANDARD DEVIATION) ON THE TOP SIDE OF CHICKEN BREAST FOR PL TREATMENT AT 3000 V AND 4.6 CM DISTANCE FROM THE LIGHT SOURCE FOR DIFFERENT NUMBER OF PULSES AND PULSE WIDTH. -----	83
TABLE 4.2. <i>SALMONELLA</i> LOG-REDUCTION, LOG (N/N_0), ON THE BOTTOM SIDE OF THE CHICKEN BREAST AFTER PL-TREATMENT DEPENDING ON PULSE WIDTH AND NUMBER OF PULSES.-----	84
TABLE 4.3. INSTRUMENTAL MEASUREMENT OF COLOR PARAMETERS L* (LIGHTNESS), A* (REDNESS), AND B* (YELLOWNESS) ON TOP CHICKEN BREAST FOR PL-TREATED AND UNTREATED SAMPLES.-----	87
TABLE 4.4. SENSORY DFC TEST SCORE (AVERAGE ± STANDARD DEVIATION) ABOUT GLOBAL APPEARANCE FOR ASSESSING CONTROL <i>V/S.</i> PL-TREATED/UNTREATED FROZEN, THAWED, AND COOKED SAMPLES. PANELISTS' SCORE WAS 0 = NO	

DIFFERENCE THAN CONTROL, 2 = LOW DIFFERENCE THAN CONTROL, 4 = MODERATE DIFFERENCE FROM CONTROL, 6 = DIFFERENT FROM CONTROL, 8 = EXTREMELY DIFFERENT THAN CONTROL. PL-TREATED SAMPLES RECEIVED 1, 3, AND 6 PULSES (420 μ S AT 3000 V AND 4.6 CM FROM THE LIGHT SOURCE). STATICAL ANALYSIS USED ANOVA AND DUNNETT TEST. MSD IS THE MINIMUM SIGNIFICANT DIFFERENCE.----- 89

TABLE 5.1. *SALMONELLA* LOG REDUCTION ON FROZEN CHICKEN BREAST FILLET TOP SURFACE -----96

TABLE 5.2. *SALMONELLA* LOG REDUCTION ON FROZEN CHICKEN BREAST FILLET TOP SURFACE VERSUS FRESH CHICKEN BREAST FILLET TOP SURFACE----- 97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABPA - Associação Brasileira de Proteínas Animal

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APPCC – Análise Perigos e Pontos Críticos de Controle

BPA - Boas Práticas Agropecuárias

BPF - Boas Práticas de Fabricação

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

CIELab - Commission Internationale de L'Eclairage

DTA – Doenças Transmitidas por alimentos

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DMS – Diferença mínima significativa

DIPOA – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EUA – Estados Unidos da América

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA - Food and Drug Administration

FSIS – Food Safety and Inspection Service

IAFP - International Association for Food Protection

IFASAC - Interagency Food Safety Analytics Collaboration

ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods

IN – Instrução Normativa

IR – Infrared (em português, infravermelho)

LP- Luz Pulsada (em inglês, PL – Pulsed Light)

LED - Light Emitting Diode

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MS – Ministério da Saúde

N – Concentração microbiana

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCC – Ponto Crítico de Controle

PNCRC - Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

PE - Polietileno

RIISPOA – Regulamento de inspeção de produtos de origem animal

SDA - Secretaria de Defesa Agropecuária

SIF – Serviço de Inspeção Federal

T – Temperatura (°C)

UFC – Unidades formadoras de colônia

UV – Ultravioleta

UHT – Ultra-high Temperature

USDA - United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

DIAGRAMA CONCEITUAL	20
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	21
1.INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVO GERAL	24
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 LUZ PULSADA	26
2.1.1 <i>Parâmetros da luz pulsada</i>	32
2.1.2 <i>Fatores que influenciam o tratamento de luz pulsada</i>	33
2.1.3 <i>Os efeitos da luz pulsada em micro-organismos</i>	36
2.1.4 <i>Trabalhos com luz pulsada em alimentos</i>	38
2.2 SALMONELLA	42
2.2.1 <i>Contaminação de carne de frango por Salmonella</i>	45
2.3 CARNE DE FRANGO	47
2.3.1 <i>Processo de abate e processamento de carne de frango</i>	50
2.3.2 <i>Peito de frango</i>	54
CAPÍTULO 3 - LUZ PULSADA PARA INATIVAÇÃO DE SALMONELLA EM MEIO DE CULTURA	59
3. Effective Pulsed Light Treatments For Inactivating Salmonella Enterica Serotypes	60
3.1 INTRODUCTION	60
3.2 MATERIALS AND METHODS	63
3.2.1 <i>Pulsed Light system</i>	63
3.2.2 <i>Bacterial suspensions</i>	64
3.2.3 <i>Inactivation procedure and microbial enumeration</i>	64
3.2.4 <i>Kinetic modeling</i>	65
3.2.5 <i>Statistical analysis</i>	65

3.3. RESULTS AND DISCUSSION	65
3.3.1 <i>PL treatment parameters</i>	65
3.3.2 <i>PL inactivation of Salmonella: treatment and serotype effects</i>	68
3.4. CONCLUSIONS	71

CAPÍTULO 4 - LUZ PULSADA PARA INATIVAÇÃO DE *SALMONELLA* EM PEITO DE FRANGO RESFRIADO ----- **73**

4. Pulsed Light Treatment of Chicken Breast Surfaces: *Salmonella enterica* reduction and quality attributes ----- **74**

4.1 INTRODUCTION----- **74**

4.2. MATERIALS AND METHODS----- **76**

4.2.1 *Chicken breast fillets samples* ----- 76

4.2.2 *Inoculum and inoculation* ----- 77

4.2.3 *Microbial enumeration* ----- 78

4.2.4 *Pulsed Light treatment* ----- 78

4.2.5 *Temperature measurement*----- 79

4.2.6 *Confocal microscopy* ----- 79

4.2.7 *Instrumental color measurement*----- 80

4.2.8 *Sensory evaluation* ----- 80

4.2.9 *Statistical analysis* ----- 81

4.3. RESULTS AND DISCUSSION ----- **81**

4.3.1 *Energy delivered and temperature increase*----- 81

4.3.2 *Salmonella reduction on samples' top surface*----- 81

4.3.3 *Salmonella reduction on samples' bottom surface* ----- 84

4.3.4 *Instrumental Color*----- 86

4.3.5 *Sensory evaluation* ----- 87

4.4. CONCLUSIONS ----- **90**

CAPÍTULO 5 - LUZ PULSADA NA INATIVAÇÃO DE *SALMONELLA* EM PEITO DE FRANGO CONGELADO ----- **91**

5. Pulsed Light Treatment On Frozen Chicken Breast: *Salmonella Enterica* Reduction **91**

5.1 INTRODUCTION	92
5.2.MATERIALS AND METHODS	93
5.2.1 <i>Samonella enterica inoculum and inoculation</i>	93
5.2.2 <i>Chicken breast fillet samples</i>	93
5.2.3 <i>Microbiological Analysis</i>	95
5.3. RESULTS AND DISCUSSION	96
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES	99
6.1 TRABALHOS FUTUROS	101
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

DIAGRAMA CONCEITUAL

O diagrama conceitual sumariza o estudo e a motivação do presente trabalho:

O quê?

Utilizar a luz pulsada para a inativação de *Salmonella* em meio de cultura e nas superfícies do filé de peito de frango nas condições de resfriado e congelado.

Por quê?

O tratamento térmico é utilizado para garantir a inativação da *Salmonella* em carne de frango. No entanto, para manter a condição do alimento cru e fresco do peito de frango *in natura* e, ainda assim, garantir a segurança e inocuidade do alimento, exige-se uma tecnologia alternativa. A luz pulsada é um método não-térmico, promissor para descontaminação de superfícies de alimentos.

O que já foi feito?

Alguns trabalhos de luz pulsada em peito de frango já foram encontrados na literatura. *S. Typhimurium* é o principal alvo dos estudos de inativação por luz pulsada em carne de frango e em meio de cultura, porém, não foram abordadas as diferentes sorovares de *Salmonella enterica*. Os estudos, até o momento, não abordaram o uso de luz pulsada nas diferentes superfícies (parte superior *versus* inferior) do filé de peito de frango, bem como não foram exploradas as condições de resfriado *versus* congelado.

Hipóteses

- ✓ Há diferença do efeito da luz pulsada para a inativação das diferentes sorovares de *Salmonella enterica* em meio de cultura;
- ✓ A letalidade das diferentes sorovares de *Salmonella enterica* em meio de cultura é dependente dos parâmetros de luz pulsada;
- ✓ O tratamento de luz pulsada para inativação de *Salmonella* é dependente da superfície do peito de frango (parte superior *versus* parte inferior);
- ✓ Os diferentes tratamentos de luz pulsada e sua intensidade não influenciam na qualidade do peito de frango resfriado;
- ✓ A condição de congelamento do peito de frango pode exercer influência na inativação de sorovares de *Salmonella* por luz pulsada quando comparado com o peito de frango resfriado.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

Este capítulo irá apresentar a introdução, a motivação e a relevância do estudo, bem como os objetivos, geral e específicos.

1. INTRODUÇÃO

À medida que a população global continua a crescer, também aumenta a demanda pelo fornecimento e disponibilidade de alimentos nutritivos e seguros. Segundo FAOSTAT (2017), a população mundial pode chegar a 9,8 bilhões de pessoas em 2050. Este crescimento traz desafios adicionais à indústria de processamento de alimentos, incluindo a necessidade de diversificar a cadeia de abastecimento para atender às mudanças nas dietas, à demanda por produtos minimamente processados, ao envelhecimento crescente da população que reflete em restrições alimentares, às doenças relacionadas aos alimentos, à segurança alimentar, e às influências étnicas e culturais. A mudança climática também irá impulsionar a escolha da inovação como preferência pelo desenvolvimento de processos de alimentos, sendo eles menos intensos em água e energia, e ecologicamente corretos (ROWAN, 2019). O mencionado acima destaca uma tendência de aumento da complexidade da cadeia de abastecimento de alimentos, que requer maior colaboração de tecnologias e harmonização dos esforços de gestão para lidar de forma adequada com os riscos aos consumidores, incluindo a segurança dos alimentos.

A carne de frango é um dos alimentos mais presentes na dieta dos brasileiros, e de toda população mundial, configurando-se assim como um negócio relevante. No Brasil, em média, cada brasileiro consome 45,27 kg de carne de frango por ano (ABPA, 2020). Segundo o relatório anual produzido pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2020), o Brasil produziu 13,845 milhões de toneladas de carne de frango no ano de 2020. Desse total, 69% foram destinadas para o mercado interno e 31% para exportação, o que faz do Brasil o país líder mundial na exportação de carne de frango. Do total produzido, 25,26% foram exportados como frango inteiro *in natura* (*griller*) e 66,99%, em cortes de frango *in natura*. Mas, atrelado ao consumo de carne de frango, tem-se a preocupação frequente com a questão de segurança dos alimentos, visto que existem riscos associados à presença de micro-organismos patogênicos. O consumo de carne de frango contaminada tem causado inúmeros surtos e casos isolados de enfermidades (BORGES et al., 2017), sendo que em países em desenvolvimento esses dados muitas vezes não são contabilizados, não gerando estatísticas

que chamam a atenção dos governantes para a importância da garantia da segurança de alimentos em termos de saúde pública e economia.

Embora os padrões industriais de segurança alimentar tenham sido cada vez mais elevados, a *Salmonella* continua a persistir na indústria de alimentos, como uma bactéria patogênica relevante em números, e um foco de preocupação decorrente de doenças transmitidas por alimentos. A *Salmonella* é conhecida como um agente etiológico que transmite infecções dos alimentos para os humanos, como por exemplo, a salmonelose. Dentre os alimentos, os ovos e a carne de frango, são os principais veículos de transmissão da salmonelose. Embora, a família *Salmonella* inclua mais de 260 sorotipos, *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* são os mais comumente sorotipos identificados na incidência de salmonelose (MUKHOPADHYAY; RAMASWAMY, 2012), sendo frequentemente associados ao consumo de carnes de frango. Na última década, os sorotipos de *Salmonella* predominantes encontrados na carne de frango e na indústria no Brasil foram *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* (BORGES et al., 2017).

Considerando a carne como um excelente substrato para o crescimento microbiano, métodos de descontaminação que mantenham a segurança e a qualidade do produto são demandas da indústria de alimentos e dos consumidores. Diante deste cenário, as tecnologias não-térmicas estão sendo pesquisadas e desenvolvidas para promover a segurança dos alimentos, sendo uma alternativa para descontaminar os produtos mantendo o aspecto *in natura* (MAÑAS; PAGÁN, 2005). Assim, para que o consumidor adquira produtos de qualidade, com características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas ideais tem-se testado diversas tecnologias alternativas na indústria alimentícia. A aplicação de tecnologias não-térmicas vem como alternativa às tecnologias convencionais se tornando cada vez mais interessante na indústria alimentícia, a fim de alcançar a máxima segurança alimentar e o mínimo de perdas nutricionais, e de sabor semelhante ao produto fresco (*in natura*) (GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS, 2004, HEINRICH et al., 2016). A aplicação de tecnologias não-térmicas como alternativa frente às tecnologias convencionais vem se tornando comum na indústria alimentícia, a fim de alcançar a máxima segurança dos alimentos.

As principais tecnologias não-térmicas são: luz ultravioleta, luz pulsada, alta pressão hidrostática, ultrassom, plasma a frio, entre outras. O uso da luz ultravioleta no comprimento de onda UV-C é suficiente para causar danos no DNA dos micro-organismos, levando-os a morte. A luz pulsada é uma técnica, derivada da luz UV, que promove a exposição do produto a pulsos intensos de luz (nas regiões infravermelha, visível e ultravioleta) causando a morte de

células microbianas, em temperatura ambiente (KRAMER; WUNDERLICH; MURANYI, 2017).

Luz pulsada é um método rápido de descontaminação de superfícies, que possibilita melhorar a segurança do alimento e estender a sua vida útil (SCHOTTROFF et al., 2018), sendo considerada como uma boa relação custo-benefício, visto que não gera resíduos indesejados nos alimentos (ROWAN, 2019 ; HEINRICH et al., 2016). O tratamento por luz pulsada visa manter as propriedades de alimentos frescos por meio de mudanças mínimas na textura, cor, composição química e atributos sensoriais, além de visar a segurança microbiológica do alimento.

Medidas efetivas de controle na produção primária, mundialmente, ainda são requeridas para garantir a ausência da *Salmonella* em carnes *in natura* de aves, sendo estes produtos os principais veiculadores do patógeno ao homem. No Brasil, devido às limitações tecnológicas que impossibilitam garantir a ausência deste micro-organismo no produto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS) excluiu a obrigatoriedade da pesquisa de *Salmonelas*. em carnes *in natura* de aves, por meio da Resolução RDC nº 12/2001 (BRASIL, 2001). Na Resolução RDC nº 13/2001 (BRASIL, 2001) instituiu-se a exigência de dizeres na rotulagem, visando instruir o consumidor sobre o uso, o preparo e a conservação adequada destes produtos. No entanto, a rotulagem não exclui o risco de contaminação cruzada que pode ser causada a partir do uso compartilhado durante o preparo desse produto *in natura* e outros alimentos que não serão processados. Além disso, a ausência de *Salmonella* é um requisito legal para exportação de carnes de aves cruas para Europa e outros países importadores. No Brasil, a Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016, permite até 20% de positividade para *Salmonella spp.* nas carcaças de frango.

Nos EUA, a legislação considera o fato que a prevalência de *Salmonella* varia entre as diferentes fases de processamento e produtos que são vendidos no varejo, o USDA tem padrões de desempenho diferentes para produtos de frango. O objetivo desses padrões de desempenho não é especificamente determinar a prevalência de *Salmonella* em diferentes produtos, mas para monitorar a eficácia dos procedimentos de processamento para limitar a contaminação. Para carcaças de frangos, frango triturado e partes de frango, as porcentagens máximas aceitáveis daqueles positivos para *Salmonella* em um período de 52 semanas são 9,8%, 25% e 15,4%, respectivamente (FSIS) (CQ PRESS, 2020). As instalações que correm o risco de não atingir a porcentagem positiva máxima permitida durante a janela de 52 semanas concluída mais recentemente recebem um aviso da USDA/FSIS e são aconselhadas a fazer

alterações imediatas para evitar falhas no padrão de desempenho. As instalações que não atendem ao padrão de desempenho recebem um aviso de falha e devem se reunir com o FSIS para desenvolver medidas corretivas. O problema deve ser resolvido dentro de 30 dias antes de serem tomadas outras medidas de coação. Apesar das inúmeras melhorias nas medidas de segurança alimentar e nos protocolos de inspeção mais rígidos, ainda existem desafios emergentes associados à *Salmonella* no processamento de frangos de corte.

No Brasil, para reduzir ou eliminar a presença indesejável desse patógeno ao longo da cadeia produtiva, foram estabelecidos vários procedimentos e controles, como as Boas Práticas Agropecuárias (BPA), Programas de Biossegurança, Programas de Autocontroles, Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), entre outros. Mesmo com estas condições de controle de processo, as atuais operações no processamento de carne de frango não eliminam totalmente micro-organismos de carcaças contaminadas, ou pós-contaminadas. Por isso, pesquisas que indiquem o uso de intervenções tecnológicas, sendo processos complementares ou mesmo barreiras são necessárias. Embora, a legislação atual no Brasil e em vários países não permita qualquer tratamento do produto *in natura*, além do uso de água, pesquisas que demonstrem a melhoria da qualidade desse produto podem gerar interesse nas indústrias, políticas e consumidores, e assim uma mudança na legislação pode ser requerida.

A bactéria *Salmonella* é uma grande preocupação de saúde pública, das indústrias e consumidores, pois a condição da carne de frango crua pode ter contaminação potencial. A presença desta bactéria nos cortes de carnes de aves *in natura* implica em perdas econômicas para a indústria, embargo e cancelamento de exportações com possível perda de mercado e clientes. Tecnologias não-térmicas, aplicáveis a carnes *in natura*, para inativação microbiológica com manutenção da qualidade sensorial são de suma interesse.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da intensidade e do modo de aplicação da tecnologia de luz pulsada na inativação de quatro sorovares de *Salmonella entérica* individualmente e em conjunto inoculadas em meio de cultura e nas superfícies de filé de peito de frango resfriado e congelado.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o valor dos parâmetros (tensão elétrica aplicada e duração do pulso de luz) efetivos para a inativação individualmente e em conjunto de quatro sorovares de *Salmonella* entérica (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* e *S. Minnesota*) inoculadas na superfície de meio de cultura sólido;

- Predizer a inativação da *Salmonella* na superfície de meio de cultura sólido a partir do modelo de Weibull;

- Determinar o valor dos parâmetros de fatores físicos (quantidade e duração dos pulsos de luz) efetivos para a inativação do conjunto dos quatro sorovares de *Salmonella* inoculadas em filé de peito de frango resfriado;

- Comparar a inativação pelo tratamento por luz pulsada do conjunto das quatro sorovares de *Salmonella* inoculados nas superfícies superior e inferior do filé de peito de frango resfriado;

- Comparar a inativação pelo tratamento por luz pulsada do conjunto dos quatro sorovares de *Salmonella* inoculados na superfície superior do filé de peito de frango na condição resfriado *versus* congelado;

- Avaliar o impacto do tratamento por luz pulsada na temperatura e na qualidade (cor instrumental e sensorial) do filé de peito de frango resfriado.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica contemplando tópicos importantes para a compreensão deste trabalho. O presente capítulo foi dividido em 03 tópicos, 1) uma revisão sobre a tecnologia de luz pulsada, iniciando por uma visão geral das tecnologias não-térmicas, em especial a luz UV e luz pulsada, explorando os subtópicos sobre os parâmetros da luz pulsada, os efeitos da luz pulsada para inativação de micro-organismos e trabalhos com luz pulsada em alimentos; 2) No segundo tópico são descritos conceitos sobre a *Salmonella*, elucidando as características da bactéria e fatores da contaminação cruzada em carne de frango; e no tópico 3) A carne de frango é descrita, explorando os subtópicos sobre o processamento de carne de frango e, em especial, o corte peito de frango, sendo a matéria-prima utilizada neste trabalho.

2.1 LUZ PULSADA

As tecnologias não-térmicas são aquelas capazes de inativar micro-organismos de interesse, sem ou com o mínimo de aumento da temperatura do produto, sendo assim, não alteram ou alteram pouco a estrutura e a qualidade dos produtos. Estão ganhando cada vez mais atenção no campo de alimentos minimamente processados, a fim de melhorar a segurança microbiológica e estender a vida útil. Apresentam como vantagens a manutenção do sabor, cor, aroma, textura dos alimentos processados, quando comparados aos mesmos alimentos processados com emprego de calor (processamento térmico). Também podem apresentar melhorias na eficiência dos processos com redução dos custos de energia (MUKHOPADHYAY; RAMASWAMY, 2012). As tecnologias não-térmicas se mostram aplicáveis especialmente para os produtos à base de carne, que são vulneráveis à deterioração microbiana em um curto espaço de tempo. As tecnologias não-térmicas são frequentemente usadas para designar tecnologias que são efetivas em temperatura ambiente (VAN IMPE et al., 2018). São exemplos de tecnologias não-térmicas como alternativas para inativação microbiana: tecnologias de radiação eletromagnética entre elas, luz ultravioleta, diodo emissor de luz (LED), luz pulsada, *eletro beam*, irradiação gama (VAN IMPE et al., 2018).

A luz pulsada diferencia-se da luz ultravioleta, por utilizar pulsos de luz de alta intensidade de energia em curtos tempos. Sendo assim, a luz pulsada é uma variante da luz UV contínua. A luz pulsada também é conhecida como luz UV pulsada, luz pulsada intensa,

luz pulsada de alta intensidade, luz UV de amplo espectro de alta intensidade e/ou luz branca pulsada (HEINRICH et al., 2016).

A radiação eletromagnética divide-se em ionizante e não-ionizante, ambas livres de resíduos químicos após o tratamento. A radiação ionizante tem a habilidade de ionizar os componentes ao longo do caminho, criando assim um alto conteúdo de radicais livres ionizáveis, com raios gama, produz íons livres e torna as moléculas extremamente reativas. A radiação não-ionizante engloba a radiação eletromagnética, como ondas de rádio, infravermelho, luz UV, luz visível e micro-ondas. A radiação não-ionizante não possui tanta energia para alcançar e ionizar as moléculas no seu caminho, mas sim causa a vibração das moléculas e assim, gerando calor no processo (KOUTCHMA, 2008).

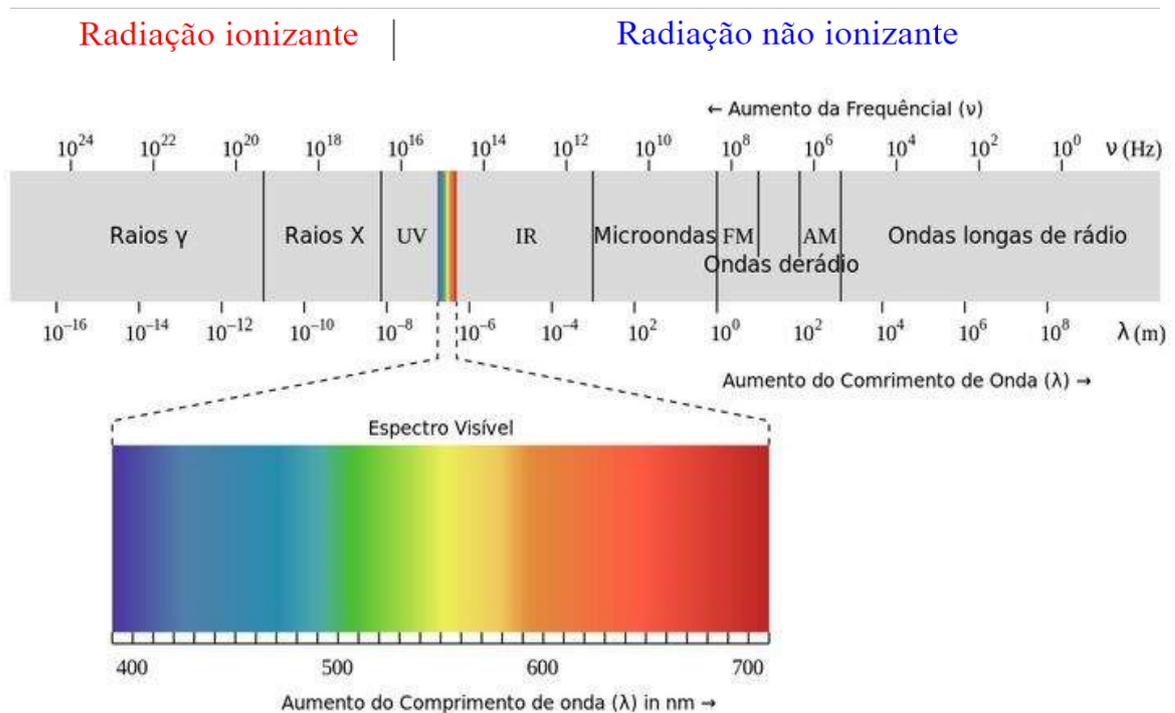
Na Tabela 2.1, apresenta-se um resumo das tecnologias não-térmicas baseadas em radiação eletromagnética, o qual exemplifica e ilustra estes processos, e na Figura 2.1 são apresentados os comprimentos de onda e a frequência de cada uma das tecnologias que envolvem o espectro eletromagnético

Tabela 2.1. Tecnologias não-térmicas baseadas em radiação eletromagnética.

Fonte	Processo	Penetração	Intensidade de Operação
Radiação eletromagnética	Radiação Não-Ionizante	Baixa	
	Luz UV	Superficial	mJ/cm ²
	LED		
Radiação eletromagnética	Luz Pulsada		J/cm ²
	Radiação Ionizante	Alta	vários kGy
	Irradiação gama		(1Gy = 1J/kg)
	Eletro Beam		
	Raios X		

Fonte: Adaptado de MORARU (2011)

Figura 2.1. Figura esquemática que ilustra as faixas de comprimento de onda para radiação ionizante e não ionizante.



Fonte: *Espectro eletromagnético*. (Foto: wikimedia)

A radiação ultravioleta foi descoberta em 1801 pelo cientista alemão Johan Ritter, que percebeu uma forma invisível de luz além do violeta capaz de oxidar haletos de prata, chamada de luz ultravioleta (UV) no fim do século XIX. O efeito germicida da radiação ultravioleta foi detectado pela primeira vez em 1878, mas as primeiras unidades de processamento foram construídas em 1955 na Suíça e na Áustria. Nos EUA, a tecnologia de luz ultravioleta é aplicada, desde 1930, em superfícies e no ar, em ambientes como por exemplo, em hospitais. Depois foi adaptada para a esterilização de embalagens, tais como tampas de garrafas de polietileno de alta densidade, cartões para produtos líquidos, embalagens de iogurte, copos plásticos e tampas de alumínio, e nas embalagens do sistema *Ultra-high Temperature* (UHT). Além, disso aplicações de luz UV de superfícies de frutas e hortaliças, também são usadas para eliminar micro-organismos deterioradores e assim, aumentar o tempo de vida útil (BINTSIS; LITOPOULOU-TZANETAKI; ROBINSON, 2000). A radiação ultravioleta exerce efeitos biológicos e bioquímicos, com diversas

aplicações no processamento de alimentos. Sua primeira aplicação ocorreu no tratamento de água e se estendeu para sucos, pois avanços em estudos permitiram sua aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA), na década de 90.

A luz UV ocupa ampla faixa de comprimento de onda na região não ionizante do espectro eletromagnético, entre os raios x (100 nm) e a luz visível (400 nm), cujas subdivisões constam da Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Características da luz UV.

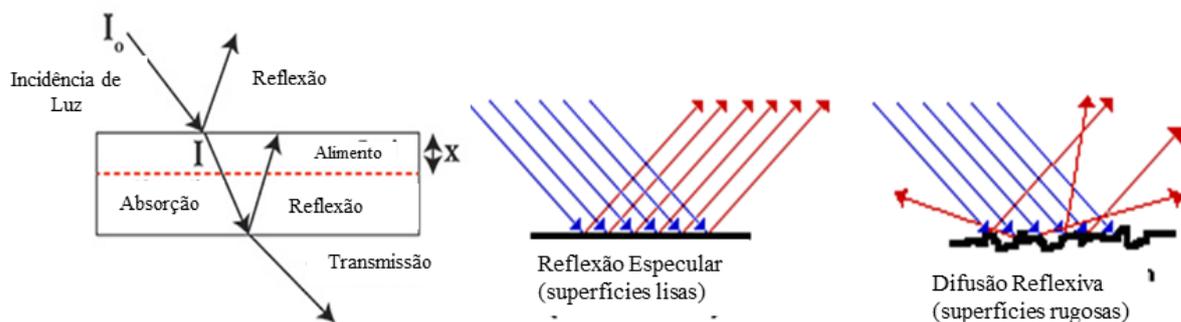
Tipo	Comprimento de onda	Varição do comprimento de onda	Características
UV-A	Longo	320-400 nm	Alterações na pele humana (bronzamento)
UV-B	Médio	280-320 nm	Queimadura da pele (câncer)
UV-C	Curto	200-280 nm	Faixa germicida (micro-organismos)
UV-V		100-200 nm	Região de UV de vácuo

Fonte: adaptado por GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS, (2004).

A radiação eletromagnética não-ionizante ultravioleta, é utilizada apenas para descontaminação de superfícies visto o baixo poder de penetração. O comprimento de onda de até 260 nm é o mais efetivo, que afeta a proteína e os ácidos nucleicos (DNA) dos micro-organismos. A porção UV da luz, causa a mutação e a destruição dos micro-organismos (MORARU, 2011). As lâmpadas de luz UV-C de ondas curtas, são em geral, lâmpadas de mercúrio projetadas para produzir energia na região germicida (aproximadamente 254 nm). São eletricamente idênticas às lâmpadas fluorescentes, exceto pela ausência de cobertura de fósforo. As lâmpadas podem ser construídas de vidro ou quartzo, material que permite a transmissão de radiação UV-C adequada para produzir energia na região germicida (KOUTCHMA, 2008). As lâmpadas de quartzo oferecem maior transmitância, no entanto, seu elevado custo faz com que sejam substituídas pelas de vidro e ainda assim, com níveis aceitáveis de transmitância. A radiação atravessa o tubo de quartzo ou vidro, e atinge os micro-organismos que estão localizados no ar, no líquido e superfícies no alcance da luz UV-C.

A absorção da luz é a transformação da energia dos fótons de luz para outras formas de energia tão logo atravesse o líquido, sendo que sua absorbância influencia a dose de luz a ser utilizada. Neste caso, a transmitância da luz UV-C de fluidos alimentares (sucos e leite) em geral é baixa comparada à água, devido à alta densidade ótica e alta absorbância e espalhamento da luz (ORLOWSKA et al., 2013). A reflexão da luz, é a mudança da direção de propagação da luz por uma superfície, sendo especular (em superfícies polidas e lisas) ou difusa (em superfícies rugosas). A refração da luz é definida como a mudança da direção da luz, da sua propagação tão logo ela passe através de um espaço entre um meio e outro. A refração ocorre quando a luz passa do ar para o quartzo e do quartzo ao líquido (KOUTCHMA, 2008). Uma ilustração de ações de reflexão, transmissão, difusão e absorção de luz pode ser visualizada na Figura 2.2.

Figura 2.2. Figura esquemática que ilustra as ações de reflexão, transmissão, difusão e absorção de luz.



Fonte: Adaptado MORARU, 2011.

A aplicação da luz UV deve ser feita diretamente sobre o alvo. Devido ao baixo grau de penetração é mais eficiente sobre superfícies totalmente lisas e materiais transparentes, como ar, água e polietileno. Os comprimentos de onda mais eficazes na região UV-C para a inativação de micro-organismos situam-se a aproximadamente de 254 a 260 nm, que corresponde à região específica em que são absorvidos pelo DNA celular. Como a composição de DNA varia entre espécies, considera-se que o pico de absorção de UV-C encontra-se na faixa de 260 a 265 nm (bastante próximo ao principal comprimento de onda de emissão de lâmpadas de mercúrio de baixa pressão e da maior eficiência dessa fonte de luz na inativação de micro-organismos) (GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS, 2004).

A luz UV-C não gera subprodutos indesejáveis, ou resíduos químicos e em geral, causa mínimas alterações sensoriais (GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS, 2004; ROWAN, 2019) apresenta baixo comprimento de onda e intensa energia, assim como a energia de uma ligação química e a de um fóton, capaz de provocar sérias consequências fisiológicas como, por exemplo, a inativação do DNA, que é vital às funções metabólicas e reprodutivas de micro-organismos (KOUTCHMA, 2008). Os efeitos biológicos da luz UV-C derivam da excitação e não da ionização de moléculas. Pesquisas já têm demonstrado que este método de luz UV-C pode reduzir de 4 a 5 log UFC/g de patógenos tais como, *Salmonella*, *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* em superfícies de alimentos (SCHAEFER et al., 2007). Dugatto (2012) aplicou diferentes tratamentos UV-C em sobrecoxas de frangos para avaliar a sua influência nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos em diferentes dias de armazenamento e constatou que o número de bactérias psicotróficas reduziu significativamente logo após a aplicação da luz. O uso da radiação UV em alimentos é um método para redução microbiana em líquidos e na superfície de alimentos, sendo que diversos órgãos internacionais em vários países já aprovam o seu uso, porém a indústria ainda utiliza pouco essa tecnologia (ROWAN, 2019) Como desvantagens e limitações da utilização do processo de luz UV, pode-se citar que a eficácia depende da topografia dos materiais, e os longos tempos de inativação (KOUTCHMA, 2008).

O princípio tecnológico da luz pulsada é baseado no acúmulo de alta tensão de descarga em um capacitor onde a energia armazenada é fornecida em pulsos ultracurtos através de uma fonte de luz, produz pulsos de luz intensos no comprimento de onda na faixa de 100 a 1100 nm, que abrange infravermelho (700–1.100 nm), luz visível (400–700 nm) e uma fração da luz ultravioleta (180–400 nm) (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007; MORARU, 2011). A curta duração dos pulsos de luz, associada às altas doses de radiação não-ionizante composta por luz UV, promove vantagens do tratamento de luz pulsada sobre os tratamentos em luz contínua, quando uma inativação rápida é requerida (MORARU, 2011). Os mecanismos de inativação de microorganismos, de acordo com Van Impe et al. (2018) para tecnologias baseadas em luz pulsada podem ser resumidas em : (i) danos, incluindo danos oxidativos à membrana celular e danos ao DNA (ii) danos ao revestimento de esporos e (iii) inativação de enzimas e modificação química (ROWAN et al., 2015). A caracterização da cinética de inativação microbiana foi adequadamente demonstrada por vários autores (ROWAN, 2019). Em geral, tem sido considerado que a eficiência da inativação microbiana por luz pulsada é maior em comparação com a luz UV de baixa pressão de onda contínua devido à sua alta potência de pico de energia juntamente com a capacidade de fornecer sua energia armazenada

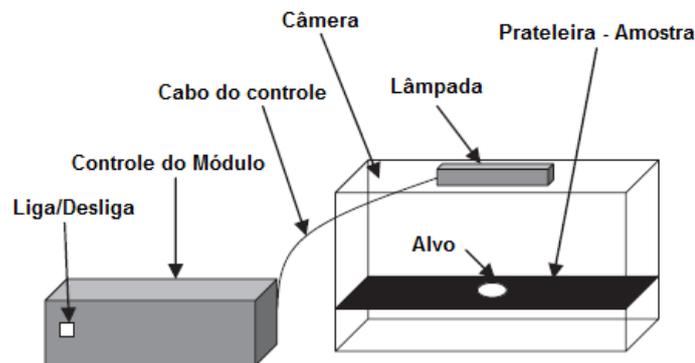
em curtos períodos, normalmente 1 a 10 pulsos por segundo (ROWAN, 1999). Além disso, a luz pulsada tem vantagens ambientais, já que não envolve compostos químicos com possíveis impactos ambientais negativos, uma vez que as lâmpadas de xenônio, não contêm mercúrio com a luz UV-C (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007).

2.1.1 Parâmetros da luz pulsada

Os principais parâmetros para descrever a luz pulsada são a tensão elétrica ou voltagem de entrada (V), o comprimento, largura ou duração de pulso (t) [μs a ms], o número de pulsos (n), a fluência (F) [J/cm^2], tempo de exposição ($n * t$) [s], taxa de fluência ou irradiância [W/cm^2], frequência [Hz] (HEINRICH et al., 2016). A fluência é, em geral, o parâmetro apropriado para descrever a eficácia da luz pulsada, pois permite medir a quantidade de energia que atinge a área de exposição do objeto de destino. Portanto, a dinâmica de inativação microbiana depende da fluência aplicada (ROWAN et al., 1999).

Os componentes de um equipamento básico de luz pulsada compreendem uma unidade de energia para geração de pulsos de alta potência e uma câmara de tratamento onde os pulsos são transformados em pulsos de luz de alta potência (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2005; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007). As lâmpadas podem estar posicionadas acima, abaixo ou ao redor do objeto alvo em uma câmara ou túnel de tratamento bem fechado. Uma unidade típica de aplicação da tecnologia de luz pulsada é formada pelos componentes ilustrados na Figura 2.3.

Figura 2.3. Representação Esquemática - unidade experimental de luz pulsada.



Fonte: Adaptado Xenon Corporation, 2015.

Após várias adaptações e patentes da tecnologia de luz pulsada, o FDA aprovou a aplicação na produção, processamento e manuseio de alimentos (Food and Drug

Administration, 1996), sob o código 21CFR179.41. A avaliação da segurança dos alimentos tratados com todas as formas de radiação, o FDA considera mudanças na composição química dos alimentos que podem ser induzidos pelo tratamento proposto, incluindo quaisquer alterações potenciais. Pode ser aplicado em várias etapas de processamento de alimentos (HEINRICH et al., 2016).

Apesar da quantidade de publicações e de ter obtido a aprovação desde 1996 para aplicações de desinfecção de superfícies de alimentos, a tecnologia de luz pulsada ainda não é usada em grande escala pela indústria. Quaisquer esforços futuros feitos para desenvolver o processo de luz pulsada precisam ser otimizados com base nas recomendações preliminares do FDA:

- O tratamento cumulativo total, em termos de fluência total, não deve exceder 12 J/cm²;
- A duração dos pulsos dever ser menor que 2 ms;
- Frequências de pulso típicas usadas na faixa de 1 a 20 pulsos por segundo.

A empresa pioneira que produziu equipamentos de luz pulsada para a desinfecção foi a PUREPULSE Technologies Inc. (San Diego, Califórnia), uma subsidiária da XENON Corporation que comercializou o sistema PureBright. Aplicações em sistemas de purificação de água e sistemas de inativação de vírus para os fabricantes biofarmacêuticos. Ainda existem poucas empresas comerciais que produzem sistemas de descontaminação com a tecnologia de luz pulsada, no mundo. São exemplos de empresas comerciais de luz pulsada: XENON Corporation presente nos EUA, a empresa CLARANOR na França, a empresa MONTENA na Suíça, e a STERIBeam Systems na Alemanha. A comercialização de equipamentos de luz pulsada só será possível quando o sistema for economicamente viável em nível industrial, além disso apenas após a customização da aplicação. Otimizar as condições de processamento são importantes para obter o nível de redução microbiológica desejada para aplicações alimentares específicas sem comprometer a qualidade permitiria um aumento de escala mais fácil.

2.1.2 Fatores que influenciam o tratamento de luz pulsada

Os fatores que influenciam o tratamento de luz pulsada são: o substrato (formato, topografia, composição físico-química etc.), o micro-organismo alvo (tipo, quantidade etc.) e

a posição da amostra em relação à lâmpada e saída espectral da unidade de luz pulsada (MORARU, 2011).

As características da superfície dos alimentos sólidos, a composição de nutrientes e a topografia das superfícies são fatores importantes para entender o efeito de descontaminação da superfície com a luz pulsada. A composição dos materiais também desempenha papel importante em afetar a eficácia da luz pulsada. Alimentos sólidos absorvem a luz e há uma redução exponencial da intensidade da luz à medida que a luz continua sendo absorvida em função da profundidade do alimento e de seu coeficiente de absorção. Existem algumas outras profundidades de penetração de estado de convenção onde a intensidade da luz é reduzida a 10% da intensidade do incidente de superfície. A profundidade de penetração é definida como tal porque a redução da intensidade da luz a uma porcentagem tão baixa não é capaz de realizar qualquer inativação além dessa profundidade, em geral, considera-se a ação limitada a uma penetração de 1 a 2 μm na camada superficial (ARTÍGUEZ; MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, 2014). Por suas características de inativação superficial, a luz pulsada é considerada mais eficaz para produtos totalmente lisos, onde os micro-organismos estariam totalmente expostos aos pulsos de luz. No entanto, as superfícies dos alimentos sólidos não são especialmente lisas. Minúsculas rachaduras e fendas superficiais podem abrigar micro-organismos, aonde a luz não chega. Grandes irregularidades na topografia da superfície atrapalha a absorção de luz pelo alimento, entre a fonte de luz e a superfície tratada, protegendo o alvo (contaminação microbiana) da incidência de fótons (luz) (HEINRICH et al., 2016). Portanto, toda a área superficial dos alimentos deve ser exposta ao tratamento de luz pulsada para que se consiga otimizar o efeito de descontaminação da superfície apesar das irregularidades superficiais, o que torna o processo bastante complexo (ELMNASSER et al., 2007). As superfícies rugosas podem causar ligação a características superficiais complexas, mas, por outro lado, superfícies altamente lisas e hidrofóbicas tendem a provocar agrupamento de células, o que em ambos os casos leva a efeitos de sombreamento que também prejudica a eficiência do tratamento de luz pulsada. (UESUGI; WOODLING; MORARU, 2007) também encontraram efeitos perceptíveis das características do substrato e do tamanho do inóculo na inativação de *L. innocua* em aço inoxidável, o que resultou em uma redução limitada da contagem e um declínio acentuado das curvas de inativação. As curvas de dose-resposta de experimentos de inativação pela luz pulsada geralmente exibem ombros iniciais e um efeito de cauda em fluências mais altas. Aspectos relevantes sobre a modelagem de curvas de inativação pela luz pulsada, incluindo uma interpretação abrangente, foram recentemente revisados por Rowan et al. (2019).

Para que um tratamento por luz pulsada seja efetivo em inativar micro-organismos, é preciso que esses micro-organismos entrem em contato com os fótons da luz pulsada. Assim, qualquer material absorvedor de luz, presente entre a fonte de luz e os micro-organismos, pode prejudicar o efeito do tratamento. Essa restrição tem implicações em termos de desempenho do processo. No caso de alimentos sólidos, há uma preocupação especial quando o alimento é opaco (ou seja, possui componentes absorvedores de luz), já que tais produtos são apenas descontaminados superficialmente. Quanto mais opaco e mais espesso o produto, menor será o nível de inativação abaixo da superfície (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2005). Para um tratamento eficaz de luz pulsada para inativação microbiana, o coeficiente de reflexão da superfície do produto deve ser baixo, e devem ter propriedades ópticas compatíveis com a aplicação. A eficácia da descontaminação aumenta quando o reflexo é baixo e os coeficientes de absorção e transmissão aumentam. Nos casos de alimentos sólidos, em geral, a luz não penetra bem, aplicação de luz pulsada é principalmente limitado à inativação de micro-organismos da superfície (ELMNASSER et al., 2007).

A composição adequada do alimento, que depende principalmente da proporção de proteína, gordura, carboidratos e água capaz de absorver luz competitivamente. Uma matriz ou superfície rica em gordura e proteína prejudicará o processo de descontaminação (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007).

Gómez-López et al. (2005) relataram a influência da carga de contaminação, sendo que maiores níveis de contaminação reduzem a eficiência da luz pulsada. A importância da distribuição de micro-organismos em uma superfície para aplicações de luz pulsada foi demonstrada por Levy et al. (2012) para endosporos de *B. subtilis*, que foram inoculados por pulverização e inoculação em gota. A formação de aglomerados causou uma forte diminuição na eficiência da luz pulsada e é mais provável de ocorrer durante a inoculação pontual em comparação com a distribuição mais fina quando a pulverização é aplicada. No entanto, em relação aos resultados com micro-organismos espalhados em superfícies de ágar Gómez-López, et al. (2005) mostraram o potencial de superestimação de letalidade devido à possibilidade de dois ou mais micro-organismos sobreviventes situados muito próximos uns aos outros podem formar apenas uma colônia e, portanto, ser contado como apenas uma colônia. Além disso, uma susceptibilidade de micro-organismos ao tratamento de luz pulsada dependente de característica da organização celular das bactérias, foi demonstrada em vários estudos, com uma tolerância geralmente maior a bactérias gram-positivas, em comparação com espécies gram-negativas (KRAMER; WUNDERLICH; MURANYI, 2017). Dependendo

do tipo de micro-organismo, até 6 unidades de log de inativação são reportadas nas superfícies, produtos de carne e redução das contagens de limita-se 3 unidades de log (HEINRICH et al., 2016; VAN IMPE et al., 2018)

2.1.3 Os efeitos da luz pulsada em micro-organismos

A tecnologia de luz pulsada leva à destruição microbiana com base em efeitos combinados, sendo eles, efeitos fotoquímicos, fototérmicos e fotofísicos. O efeito fotoquímico considera a absorção do espectro de luz UV pelo ácido desoxirribonucleico (DNA) microbiano. Como efeito da luz pulsada, a cadeia de DNA é interrompida ou as moléculas podem ser quebradas (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007), esse DNA rompido forma os dímeros de timina. Por formação de dímero, o DNA bacteriano não pode ser descompactado para replicação e, portanto, as bactérias não podem se reproduzir. Em geral, se aceita que a luz pulsada inativa micro-organismos em função da absorção da luz UV pelo ácido desoxirribonucleico (DNA) microbiano, mas também outros mecanismos podem contribuir para a inativação (ROWAN et al., 1999). Apesar de haver um consenso sobre o efeito do espectro da porção da luz UV na inativação microbiana pela luz pulsada, o mecanismo pelo qual a luz pulsada causa a inativação ainda não é totalmente esclarecido e entendido. Um número significativo de evidências suporta a hipótese que a inativação ocorra como um resultado da absorção da porção de espectro de luz pelo DNA entre 190 e 300 nm, correspondendo ao UV emitido durante os flashes (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007).

Um efeito de inativação fotoquimicamente induzido não deve ser determinado apenas pelo parâmetro de dosagem de energia, pois depende apenas do número total de fótons (GÓMEZ-LÓPEZ; BOLTON, 2016). Portanto, uma dose de energia mais alta deve ter o mesmo efeito que vários flashes de luz de dose de energia mais baixa, desde que o espectro de luz seja igual. Isso foi confirmado por Levy et al. (2012) para os endosporos de *B. subtilis* e *B. cereus*, bem como células vegetativas em uma superfície de ágar, fornecendo fluências entre 0,5 e 1,5 J/cm² com um a cinco flashes de luz. No entanto, a inativação de *A. niger* em poliestireno foi fortemente influenciada pela forma de entrada de energia sendo muito menor quando vários pulsos de luz de baixa energia foram aplicados ao invés de apenas um flash de luz de alta energia. Luksiene et al. (2009) relataram que a inativação de *Salmonella Typhimurium* em meio de cultura não dependia da frequência aplicada de pulsos na faixa de 1–5 Hz. Lasagabaster et al. (2013) sublinharam que a fluência total que atinge as amostras é o fator de processo mais relevante para a inativação microbiana, de *Listeria innocua* em meio

de cultura. Enquanto, Artíguez e Martínez de Marañón (2014) também demonstraram que a eficácia de luz pulsada depende apenas da fluência total ao atingir o alvo, mas não na tensão de entrada. Cheigh, Hwang e Chung (2013) confirmaram uma inativação mais rápida e eficaz de *L. monocytogenes* em meio de cultura por luz pulsada em comparação com luz UV-C. Portanto, ainda precisa ser esclarecido se a intensidade e a potência de pico da fluência aplicada têm um impacto considerável. Alguns equipamentos de luz pulsada podem requerer mais de 50 flashes para atingir uma inativação significativa e outros apenas 1 ou 2 flashes. Sendo assim, é necessária uma avaliação mais abrangente dos fatores envolvidos na eficiência da tecnologia de luz pulsada (ROWAN et al., 1999).

O efeito fotofísico da luz pulsada induz ruptura física nas estruturas celulares microbianas, devido aos pulsos intermitentes de alta intensidade. Pesquisadores observaram danos na parede celular, ruptura de membrana, dano ao citoplasma, etc. em células bacterianas expostas à luz pulsada, mesmo quando o aumento da temperatura foi insignificante, sugerindo que os efeitos fotofísicos podem desempenhar um papel relevante na inativação microbiana (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007). Os efeitos fotofísicos compreendem a morte celular a partir de danos estruturais irreversíveis das células e outros mecanismos térmicos, que causam a morte celular devido a perturbações e explosões (ROWAN et al., 1999). O tipo de dano depende fortemente do micro-organismo e da configuração experimental. Esses mecanismos inter-relacionados atuam em paralelo ou em sequência. Além disso, a adaptação evolutiva de algumas bactérias frequentemente expostas à luz solar pode contribuir para uma maior resistência à luz pulsada. O tamanho das bactérias é outro fator crucial para a resistência à luz pulsada, pois as células maiores são geralmente mais suscetíveis ao tratamento do que os organismos menores (WEKHOF, 2000).

O efeito fototérmico é com base no aquecimento localizado e instantâneo de bactérias e é induzido pelas pulsos de luz de alta intensidade, provocando um efeito fototérmico devido à diferença na taxa de aquecimento e resfriamento e nas características de absorção das bactérias e da matriz circundante. Assim, a célula bacteriana atua como um centro de vaporização local e pode levar à destruição da membrana e ruptura da parede celular. O estresse térmico leva à essa ruptura celular, especialmente em altas densidades de fluência ($> 0,5 \text{ J/cm}^2$) (KEKLIK; KRISHNAMURTHY; DEMIRCI, 2012). Mesmo sendo considerada uma tecnologia não térmica, dependendo da fluência utilizada no tratamento com a luz pulsada, o aquecimento (não desejável) das amostras pode ser fator limitante, este por sua vez

pode provocar danos sensoriais e nutricionais a alimentos termo sensíveis (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007).

Embora os efeitos fototérmicos e fotofísicos possam ter influência na inativação, a maioria dos trabalhos indica que o efeito fotoquímico da luz é o principal fator que impulsiona a destruição de micro-organismos (HILTON; DE MORAES; MORARU, 2017). Esses mecanismos são responsáveis pela inativação de micro-organismos independentemente ou em combinação uns com os outros, dependendo das condições de tratamento e organismos-alvo (KEKLIK; KRISHNAMURTHY; DEMIRCI, 2012).

Os efeitos da luz pulsada têm sido relatados em vários estudos *in vitro* mostrando altos níveis de inativação de patógenos pelo efeito da luz pulsada, tanto em meio líquido como sólido. Macgregor et al. (1998) apresentaram que 512 pulsos com duração de 1 ms, um pulso por 1 Hz, e uma densidade de potência de 380 kW/cm² resultou em 6 e 7 logs UFC/g de redução de *E. coli* O157: H7 e *L. monocytogenes*, respectivamente, quando os micro-organismos foram tratados por luz pulsada em superfície de ágar. Krishnamurthy; Demirci; Irudayaraj (2004) relataram uma redução de 7 e 8 logs em solução tampão de *S. aureus* tratadas por 5 s de luz pulsada. Fine e Gervais (2004) alcançaram uma redução de 7 log de *S. Cerevisiae* em superfície de vidro e placas de quartzo. Rowan et al. (1999) realizaram um estudo do tratamento de luz pulsada sobre a bactéria *S. Enteritidis* em meio de cultura (ágar) alcançando 5,6 reduções logarítmicas frente a 3 J e 20 µs de parâmetros. Gómez-López et al. (2005) estudaram a inativação de *S. Typhimurium* em meio ágar nutriente, e obtiveram para as condições de 7 J e 1500 µs a redução logarítmica de 3,2. O estudo do tratamento com luz pulsada aplicado em meio de cultura se faz importante para conhecer o comportamento dos micro-organismos com a mínima interferência do meio e da superfície, e alcançando assim, as condições de inativação e letalidade máxima (ELMNASSER et al., 2007; HEINRICH et al., 2016).

2.1.4 Trabalhos com luz pulsada em alimentos

Vários trabalhos demonstraram a eficácia da luz pulsada para inativar micro-organismos em superfície de vários produtos alimentícios, como filés de salmão (OZER & DEMIRCI, 2006), salsichas (UESUGI & MORARU, 2009) e peito de frango (KEKLIK, DEMIRCI, & PURI, 2010). Ozer e Demirci (2006) relataram 1 log redução de *Escherichia coli* O157: H7 e *Listeria monocytogenes* com luz pulsada em filés de salmão tratados com fluência de 5,6 J/cm². Keklik et al. (2010) alcançou 2 logs redução de *Salmonella Typhimurium* em peito de

frango desossado. Mesmo os autores obtiveram redução do ciclo logarítmico de *Listeria innocua* em salsichas tratadas com luz pulsada a 30 J/cm². A descontaminação por luz pulsada é distintamente menor em superfícies e alimentos em comparação com estudos *in vitro*, sendo geralmente limitada a uma inativação máxima por cerca de 1–3 logs, e que uma inativação completa de todos os micro-organismos presentes parece impossível (HEINRICH et al., 2016)

Trabalhos sobre a descontaminação das superfícies de contato com alimentos de equipamentos em plantas de processamento, ainda são poucos. Woodling & Moraru (2007) investigaram o papel da topografia de superfície do aço inoxidável na eficácia do tratamento da luz pulsada. Eles obtiveram redução máxima de cerca de 4 logs de *L. innocua* em aço inoxidável com acabamentos de superfície variados e concluíram que a eficácia da luz pulsada foi menor em superfícies altamente lisas, bem como altamente rugosas, devido à refletividade da superfície e ocultação de células nas superfícies rugosas, respectivamente. Superfícies altamente reflexivas e ásperas (rugosas) resultaram em menor inativação de *L. innocua* em comparação com superfícies lisas e menos reflexivas, segundo experimentos de Ringus e Moraru (2013). Uesugi & Moraru (2009) demonstraram uma profundidade de penetração de 2,3 mm em salsichas pela luz pulsada para uma fluência de 9,4 J/cm² alcançando uma redução *L. innocua* de 1,39 log. Um alimento com altos níveis de lipídios e proteínas como carnes, peixes etc., e superfície com rugosidade e topografia incrementada, requer uma dose maior de luz pulsada (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007).

Como qualquer outro método, a luz pulsada tem efeitos positivos e negativos. Possíveis danos à carne e produtos cárneos devido a mudanças sensoriais (cor e odor), reações de oxidação (principalmente ácidos graxos), alterações de nutrientes e mudanças na textura, incluindo perda de água, estão entre as principais observações na literatura publicada (OMS-OLIU; MARTÍN-BELLOSO; SOLIVA-FORTUNY, 2010). Na maioria dos estudos, foi encontrado um impacto negativo dependente da dose nos principais atributos de qualidade. Por exemplo, alterações na cor foram relatadas em altas doses de energia de luz pulsada, no caso de salmão cru (PEDRÓS-GARRIDO et al., 2018a), salsicha de frango (KEKLIK; DEMIRCI; PURI, 2009), carne de frango (HAUGHTON et al., 2011, KEKLIK; DEMIRCI; PURI, 2010), presunto fatiado (WAMBURA; VERGHESE, 2011), *carpaccio* de carne e atum (GANAN et al., 2013) e carne suína (NICORESCU et al., 2014). Tratamentos intensos podem levar a mudanças imediatas de qualidade devido ao superaquecimento da superfície do produto. Isso leva à conclusão de que a otimização do tratamento em termos de intensidade de

descontaminação e impacto na matriz tratada é inevitável para garantir a aceitação do consumidor e vida útil prolongada (HIERRO et al., 2012; WAMBURA; VERGHESE, 2011).

O tratamento de luz pulsada pode ser realizado em várias etapas do processo e na cadeia de produção, uma vez que tem sido demonstrada a sua eficácia em produtos embalados (MORAES et al., 2020). Uma forma de manter a microbiota de carne fresca e carcaças de frango, o mais baixa possível desde o início poderia ser a integração da luz pulsada na etapa de refrigeração ou antes da continuação do processamento (LYON; FLETCHER; BERRANG, 2007). Assim, conseqüentemente, a carga microbiana na produção e, portanto, a chance de recontaminar produtos já processados é reduzida. A luz pulsada também pode ser usado como estratégia de intervenção em linhas de processamento, com o objetivo de evitar a contaminação cruzada entre os equipamentos e os produtos (RAJKOVIC; SMIGIC; DEVLIEGHERE, 2010).

Trabalhos relevantes para uma melhor compreensão deste trabalho foram compilados e estão apresentados no Tabela 2.3 Trabalhos utilizando luz UV e luz pulsada para inativação de *Salmonella* e outras bactérias, em carne de frango.

Tabela 2.3 Luz UV e Luz pulsada aplicadas em carne de frango.

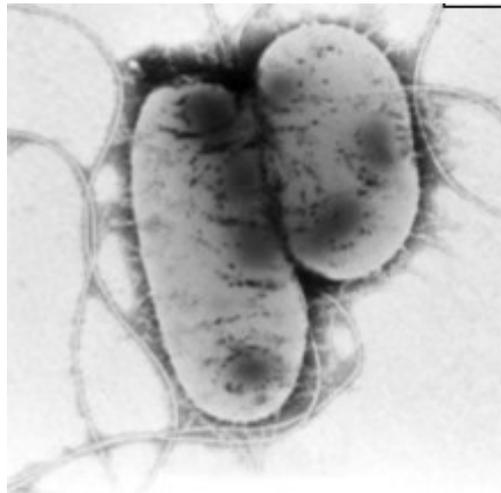
Alimento	Micro-organismo	Tecnologia e parâmetros de aplicação	Resultados	Referência
Peito de frango	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Luz pulsada 1000 pulsos 200 s Fluência 5,4 J/cm ²	Redução de 2 - 2,4 logs UFC/ml Sem alteração sensorial	LUKSIENE, et al. 2009.
Peito de frango embalado e não embalado	<i>Salmonella spp.</i>	Luz pulsada 5 cm 15 s 5 cm 30 s Luz UV-C	Redução de 0,8 a 2,4 log UFC/g	KEKLIK, et al. 2009.
Peito de Frango	<i>Salmonella Enteritidis</i>	Fluências de 0,05 a 3,0 J/cm ² 5 a 300 s Luz pulsada para e 1,25 a 18 J/cm ²	Reduções médias de 1,1 a 2,8 log UFC/cm ² na luz UV e 0,9 a 3 log UFC/cm ² na luz pulsada	MCLEOD, et al. 2017
Peito de frango e outros	<i>Salmonella Enteritidis</i>	Luz UV 0.192 J/cm ²	Redução média de 1.34 log CFU/g	HAUGHTON, et al. 2011.
Carcaças de frango	<i>Escherichia coli</i> K12	Luz pulsada 13 cm	45 s, ~1 log ₁₀ (90% redução)	KEKLIK, et al. 2011.

		45 s		
		Luz pulsada		
Sobrecoxa de frango com pele e sem pele	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium	Fluências de 62.24 J/cm ² , na distância 8cm/ 45s, 30.45 J/cm ² , 13cm/ 45s	Redução média de 2.42 log UFC/g – 45 s na superfície, sem pele, 1.82 log UFC/g – 45 s na superfície com pele	CASSAR et al. 2019.

2.2 SALMONELLA

O gênero *Salmonella* foi nomeado em função de seu descobridor Daniel E. Salmon (1850–1914). Estudos apontam que essa bactéria passou por processo evolutivo como patógeno há mais de 100 milhões de anos, tendo os bacteriófagos e a aquisição de “ilhas de patogenicidade” como essência nesta evolução. É um bacilo, gram-negativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, e persiste como uma bactéria infecciosa proeminente devido à grande diversidade dentro da subespécie (BELL; KYRIAKIDES, 2009; BRENNER et al., 2000), e pode ser visualizado na Figura 2.7. A *Salmonella* spp. é eventualmente anaeróbia, formador de esporos, com flagelos móveis, embora algumas cepas sejam imóveis.

Figura 2.4. Imagem (fotomicrografia eletrônica) de *Salmonella* spp.



Fonte: Wray e Wray/Pixabay.

O gênero *Salmonella* contém duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. No entanto, existem muitas subespécies e sorotipos dentro de cada espécie. *Salmonella* entérica possui seis subespécies expressas por nomes e algarismos romanos, as quais apresentam diferenças bioquímicas e genômicas entre si, conforme representado na Tabela 2.4. Distribuição nº de sorovares por espécie/ subespécie *Salmonella*.

Entre as espécies, a subespécie *S. entérica* apresenta maior número de sorovares, sendo responsável por 99% dos isolamentos, usualmente de animais de sangue quente. Em 2002, foram incluídos 18 novos sorovares, sendo 12 pertencentes a *S. entérica* subespécie entérica, 2 subespécies *S. salamae*, 2 *S. diarizonae*, 1 *S. houtenae* e 1 *S. bongori*. O método mais

amplamente aceito usado para diferenciar os tipos de *Salmonella* é a sorotipagem. Uma classificação de sorotipo é baseada nas propriedades do antígeno O e do (s) antígeno (s) H (FORSYTHE, 2013).

Tabela 2.4. Distribuição n° de sorovares por espécie/ subespécie *Salmonella*.

Espécie / Subespécies	Sorovares
<i>Salmonella entérica</i> subsp. <i>Entérica</i>	1.490
<i>Salmonella entérica</i> subsp. <i>Salamae</i>	500
<i>Salmonella entérica</i> subsp. <i>Arizonae</i>	94
<i>Salmonella entérica</i> subsp. <i>Diarizonae</i>	320
<i>Salmonella entérica</i> subsp. <i>Houtenae</i>	72
<i>Salmonella entérica</i> subsp. <i>Indica</i>	12
<i>Salmonella bongori</i>	22

Fonte: GRIMONT e WEILL, 2007.

O habitat natural da *Salmonella* pode ser dividido em três categorias, com base na especificidade do hospedeiro e padrão clínico por ele determinado: (1) altamente adaptadas ao homem, incluindo *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica (febres tifoide e paratifoide); (2) altamente adaptadas aos animais, representadas por *S. Dublin* (bovinos), *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* (suínos), *S. Abortusequi* (equinos), *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (aves), responsáveis pelo paratifo dos animais. Entretanto, em determinadas situações (idade, pacientes com doenças crônicas, imunocomprometidos), os sorovares *S. Dublin* e *S. Choleraesuis* podem determinar no homem um quadro septicêmico, isto é, mais grave do que o causado por *S. Typhi*; e, (3) A terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem indiferentemente o homem e os animais, designadas salmonelas zoonóticas, as quais são responsáveis por quadro de gastroenterite (enterocolite) ou por doenças de transmissão alimentar. Sua distribuição é mundial, sendo os alimentos, os principais veículos de sua transmissão. São responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países emergentes quanto nos desenvolvidos, determinando pequenos e grandes surtos, envolvendo, principalmente, o consumo de alimentos de origem animal, como ovos, aves, carnes e produtos lácteos (FORSYTHE, 2013). Todos os anos, cerca de 1,35 milhão de casos de salmonelose são relatados nos EUA. Globalmente, estima-se que 93,8 milhões de casos são causados por *Salmonella* não-tifoide todos os anos. Destes casos, estima-se que 80,3 milhões sejam de origem alimentar. A carne de aves contaminada é um dos maiores contribuintes para

a salmonelose, com alguns estudos sugerindo que as aves estão associadas a 25% dos surtos causados por patógenos de origem alimentar (THAMES; SUKUMARAN, 2020).

Muitos dos sorovares associados a infecções humanas são frequentemente encontrados em carnes de frango. Na última década, três dos sorotipos predominantes encontrados na carne de frango foram *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*. Com base em relatórios do USDA, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* estavam entre os dez sorotipos mais identificados no APPCC de frigoríficos de aves em 2014 (BORGES et al., 2017). Com base nos dados de vigilância do CDC, em 2018 os três sorotipos mais comuns relatados em infecções humanas foram *S. Enteritidis*, *S. Newport* e *S. Typhimurium*. Na Europa, a sorovar *S. Enteritidis* representa 85% dos casos de salmonelose, 38% na Ásia e 31% na América Latina e no Caribe. No Brasil, entre 2007 e 2017, 95,9% dos surtos foram causados por bactérias, a *Salmonella* spp. foi o segundo agente causador mais frequente (ANVISA, 2017). Entre as salmonelas mais isoladas de aves no Brasil, a sorovar *S. Minnesota* tem se destacado pela alta prevalência em amostras de frango e pela característica e habilidade da formação de biofilme. No Brasil, alguns sorovares mais comumente encontrados em aves são: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg*, *S. Minnesota*, *S. Agona* e *S. Mbandaka*. A *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, os quais estão entre as mais prevalentes em galinhas e tem grande importância para a saúde pública.

A *Salmonella* é facilmente destruída pelo calor, através do cozimento completo dos alimentos. Salmonelose humana causada por carne de frango tem duas rotas principais de contaminação, contaminação cruzada de alimentos não cozidos por meio de utensílios ou manuseio direto e consumo de carne malpassada ou crua (LUSTOSA et al., 2021). Um estudo de 2009 relatou uma taxa de incidência de 3,8% para *Salmonella* spp. na carne de frango, mostrando que mesmo as pequenas quantidades dessas bactérias são capazes de penetrar na carne. Isso destaca o fato de que produtos de aves malcozidos são uma importante preocupação de saúde pública (LUBER, 2009). Alguns dos parâmetros ambientais que a *Salmonella* melhor se adapta, bem como os parâmetros de letalidade térmica da bactéria, estão apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5. Parâmetros ambientais e de letalidade térmica da *Salmonella*.

Fator	Parâmetros	Valores
Ambiental	Temperatura	5 a 46°C
	pH	3,7 a 9,5
	a _w	Min 0,94
Letalidade Térmica	Valor D _{62,8°C}	0,06 min
	Valor Z	3,3 °C

Fonte: FORSYTHE, 2013.

2.2.1 Contaminação de carne de frango por *Salmonella*

Salmonella habita o trato gastrointestinal das aves, penas e a pele e pode dissipar o patógeno pela linha de abate, na indústria (BRENNER et al., 2000). A contaminação, em geral, afeta primeiro a superfície da carcaça e dessa contaminação superficial é que ocorre a contaminação interna, ou seja, da superfície para o interior do massas musculares (BELL; KYRIAKIDES, 2009).

Ao longo da linha de processamento, várias etapas apresentam risco de contaminação cruzada. Entre os produtos de aves crus, o nível mais alto de contaminação reside na carne de frango moída, com cerca de 19%. Enquanto, a contaminação nas carcaças de aves jovens é estimada em cerca de 3,9% (THAMES; SUKUMARAN, 2020). Após o abate, os tecidos são invadidos por micro-organismos contaminantes e essa contaminação é afetada por vários fatores como: a) carga microbiana do trato intestinal do animal, quanto maior esta carga, maior será a probabilidade de contaminação. Por esta razão, recomenda-se um jejum mínimo de 12 e máximo de 24 horas antes do abate; b) condição fisiológica do animal antes do abate. Quando o animal está excitado ou fadigado, as bactérias penetram com maior facilidade nos tecidos e a sangria pode ser incompleta, favorecendo o crescimento e o espalhamento bacteriano. Durante a fadiga, ocorre o consumo de glicogênio, reduzindo a queda no pH, que em condições normais cai de 7,0 para 5,7; c) método de sacrifício e sangria, quando a sangria é feita adequadamente e em boas condições sanitárias, a capacidade de conservação da carne é

maior; e d) velocidade de resfriamento, as alterações na carcaça pela flora contaminante dependem, fundamentalmente, da temperatura de conservação. O resfriamento rápido reduz a velocidade de invasão dos micro-organismos nos tecidos (FRAZIER, 1993).

Isso sugere que a contaminação cruzada aumenta à medida que a carne de frango é processada. Além da contaminação da carne de aves com *Salmonella* devido ao vazamento de conteúdo intestinal e fezes durante o processamento, ainda equipamentos de processamento, água e as mãos dos trabalhadores do processamento podem ser um foco de contaminação. O abate dos animais e as operações subsequentes como sangria, desossa, evisceração e depenagem, comuns a todos os animais, dão origem à contaminação dos tecidos subjacentes que antes eram estéreis (FRAZIER, 1993). Com exceção da superfície externa e dos tratos digestivo e respiratório, os demais tecidos dos animais contêm poucos micro-organismos, uma vez que os mecanismos de defesa animal controlam com eficiência os agentes infectivos (HAYES, 1993).

O peito de frango tem a superfície superior, abaixo da pele, uma superfície lisa. Por outro lado, a superfície inferior, é a parte que foi removida do osso esterno, que por sua vez tem a característica mais rugosa. Ambas as superfícies podem ser contaminadas por contato com outras superfícies, contaminação cruzada, neste sentido, estudar o método de descontaminação nas duas superfícies se faz necessário.

Outra grande preocupação é a formação de biofilmes por *Salmonella* em vários equipamentos e superfícies de processamento de aves. *Salmonella* em biofilmes são mais resistentes a antimicrobianos usados para saneamento e persistem nas instalações de processamento por períodos prolongados, aumentando as chances de contaminação do produto e surtos de origem alimentar (THAMES; SUKUMARAN, 2020). Diversos estudos demonstram que a *Salmonella* é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies tais como polímeros (poliestireno, polietileno, poliuretano e polipropileno) e aço inoxidável, que são comumente usados na indústria de processamento e manipulação. Assim, são necessários estudos que demonstrem a influência das superfícies na formação de biofilmes por *Salmonella* indicando os agentes químicos e físicos são mais indicados para o seu controle (SHAO; GUO; WANG, 2011).

2.3 CARNE DE FRANGO

O Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, estando atrás apenas dos EUA. Assim, a carne de frango está presente na mesa de consumidores dos cinco continentes, e com isso submetida às diversas premissas legais relativas ao tipo de mercado (EMBRAPA, 2017). Em 2020, a produção brasileira de carne de frango atingiu 13,845 milhões de toneladas, sendo 31% deste valor destinado ao mercado internacional. O consumo de carne de frango no Brasil foi de 45,27 kg/habitante, sendo o maior quando comparado à carne suína e bovina, dados de ABPA (2020). No entanto, os embargos de carne de frango do Brasil para exportação à Europa, em função de contaminação por *Salmonella*, ultrapassaram a marca de 400 mil toneladas no mês agosto de 2017, na divulgação da Operação Carne Fraca (MAPA, 2018). Por isso, programas e tratamentos que controlem esse e outros micro-organismos patogênicos na cadeia de processamento de frango ganham atenção.

A avicultura brasileira atingiu patamares de eficiência, que a transformaram em referência mundial. Com a combinação entre alta tecnologia de ambiência, genética e alimentação à base de milho e soja produzida no Brasil, em um sistema integrado entre produtores e frigoríficos, o *Brazilian Chicken* atingiu diferenciais de destaque mundial. Toda a produção é acompanhada por um complexo e detalhado programa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abate (MAPA), o Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), que avalia os autocontroles adotados pelas indústrias avícolas.

Em virtude da globalização, as barreiras sanitárias se tornaram relevantes no que diz respeito à comercialização internacional de produtos de origem animal, visto que os países importadores buscam evitar a entrada de patógenos em seus sistemas de produção. Nesse contexto, torna-se vital ao setor avícola nacional, atuar no sentido de sua estruturação para o alcance dos padrões internacionais de sanidade, de forma que os produtos brasileiros possam competir nos mercados, livres de qualquer tipo de restrição sanitária (BRASIL, 2017). A Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), responsável pela regulamentação e controle dos produtos de origem animal exportados, garante a qualidade e a segurança do alimento, conferindo ao Brasil a propriedade de exportador de carnes de qualidade. Recomendações do *Codex Alimentarius* são aplicadas nas cadeias produtivas por meio do programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle exigido pela Portaria nº. 1428, Ministério da Saúde (MS), e da Portaria

nº.46, MAPA. Essas exigências fazem com que o país apresente condições estruturais para produzir alimentos cárneos de qualidade seja para o mercado interno como para o mercado externo.

De acordo com o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), a carne de aves, corresponde às carnes obtidas de aves domésticas de criação. A carne de frango é um dos produtos mais consumidos no mundo e fornece nutrientes necessários em dietas equilibradas, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais, os quais podem variar de acordo com a raça, idade do animal, alimentação, corte, dentre outros.

O aspecto nutricional da carne de frango, em geral, é de grande relevância, visto a quantidade e a qualidade dos aminoácidos que compõe os músculos, os ácidos graxos essenciais, as vitaminas do complexo B, e ainda a concentração de ferro (QUIROGA, 2012). A composição química da carne de frango pode variar em relação às proporções de umidade, proteína e gordura (SOUZA, 2004). Em geral, ela é constituída de 60% a 80% de água e 15% a 25% de proteína. Já o conteúdo de lipídeos no músculo das aves é mais variável, pois é influenciado pela composição da dieta, pelo sexo, pela idade e pelo ambiente de criação para esse componente, os valores descritos na literatura variam de 1,5 a 5,3% na carne de peito, apresentando valores pouco mais elevados para a carne da coxa (CASTELLINI et al., 2002)). Os demais componentes da carne de frango incluem vitaminas, especificamente as do complexo B, e sais minerais, sendo mais prevalente o ferro, além de pigmentos (OLIVO, 2006). O tecido musculoesquelético representa cerca de 50% do peso da carcaça de aves, representando constituindo sua principal fração comestível. O tecido muscular é formado por fibras musculares dispostas por diferentes tecidos conjuntivos compostos por colágenos. Os músculos e fibras musculares apresentam diferentes composições segundo suas funções no organismo, o que é observado pela variação de suas colorações entre tons de vermelho, branco e intermediário e entre as proporções das frações proteicas, gordurosas e colagenosas em diferentes cortes cárneos provenientes do mesmo animal (QUIROGA, 2012, OLIVO, 2006).

A microbiota natural da carne de frango fresca é constituída de micro-organismos mesófilos e psicotróficos e os mais comumente encontrados são Enterobactérias, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Shewanella* e bactérias láticas. As bactérias patogênicas ao homem, como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Listeria monocytogenes*, também podem ser encontradas (YORK, 2005). A microbiota na carne de aves começa na sua superfície externa, e a população dos micro-organismos, depende das contagens iniciais e das condições

do processo industrial. Os tipos de micro-organismos que fazem parte da população microbiana das aves, em geral, ocorrem em 3 grupos (YORK, 2005): (01) Micro-organismos da microbiota natural da pele; (02) Micro-organismos da microbiota transitória da pele e penas no momento do abate; e, (03) Micro-organismos contaminantes devido ao processamento (equipamentos, água, contato entre aves sendo processadas e operadores).

A deterioração da carne de frango causada por micro-organismos geralmente restringe-se às superfícies externas, caracterizando-se pela formação de odores indesejáveis, limosidade e descoloração (YORK, 2005). Uma contaminação das carcaças envolve adesão das bactérias por um filme líquido sobre a pele. Além disso, na avaliação microscópica da pele, observa-se múltiplas fissuras e propensão da mesma em expandir-se quando molhada, favorecendo a retenção de bactérias. Portanto, muitas das bactérias presentes podem estar aderidas ou retidas dependendo da sua localização. Em geral, quando presentes em carcaças de frango, a *Salmonella* geralmente está em pequeno número, ou seja, cerca de 10 a 20 UFC/100g de pele, e ocasionalmente atinge números de mais de 1.000 UFC/100 g de pele (NYCHAS et al., 2008). Devido a esse baixo número de contagem de bactéria do gênero *Salmonella*, grandes áreas de superfície são normalmente amostradas para detectar sua presença.

No Brasil, o MAPA por meio da Instrução Normativa nº 70 estabeleceu o Plano Nacional de Redução de Patógenos, para abate de aves e perus (BRASIL, 2003), este plano visa a realização de monitoramento dos estabelecimentos sob fiscalização federal e, com isso, criar ferramentas auxiliares na redução da contaminação por *Salmonella*. Não é permitido no Brasil, uso de coadjuvantes para tratamentos das carcaças e cortes de frango. Nos EUA, para diminuir as contaminações microbianas, uma variedade de tratamentos de descontaminação à base de aditivos químicos é bastante explorada, e permitido, incluindo o uso de ácidos orgânicos (por exemplo, ácido peracético, láctico, cítrico e succínico), cloro, dióxido de cloro, fosfato trissódico e cloreto de sódio acidificado (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012; MOTTET; TEMPIO, 2017). No entanto, a crescente preocupação do consumidor com o uso de agentes químicos está forçando os processadores de aves a procurar métodos alternativos de descontaminação.

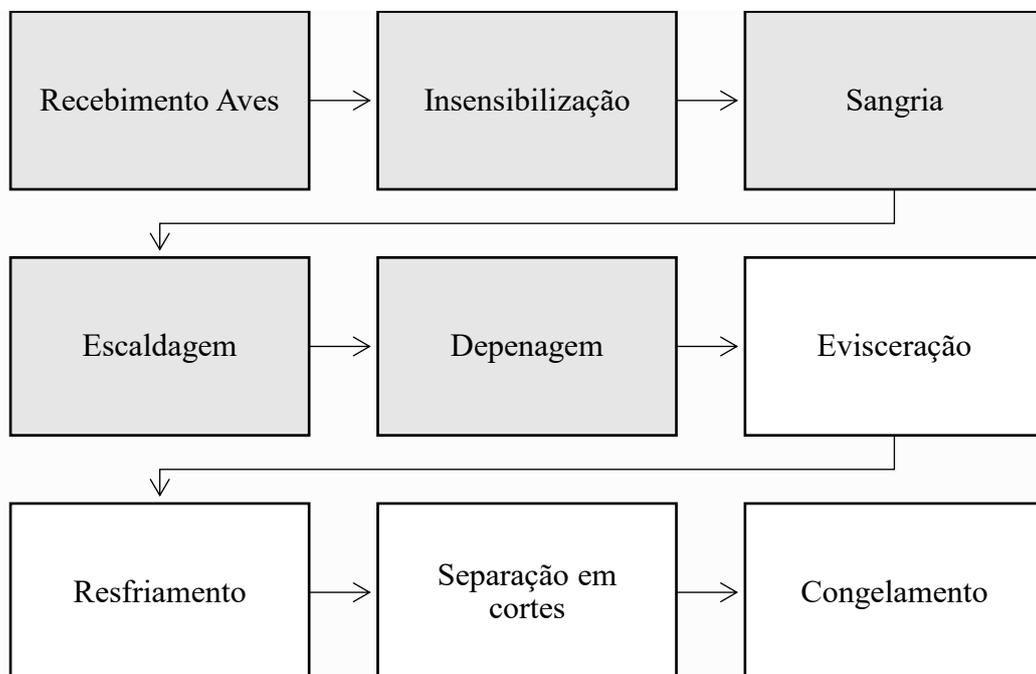
Quando a contaminação das carcaças de aves ocorre no ambiente de criação dos animais e se dissemina durante as etapas de operação de abate e processamento (MEAD, 2004), intervenções na planta de processamento podem reduzir a contagem de micro-organismos. A extensão de contaminação cruzada pode ser minimizada pela implementação de processos e

intervenções, além do controle das práticas higiênicas durante o abate e o resfriamento, e algumas medidas de controle, incluindo separação de lotes positivos.

2.3.1 Processo de abate e processamento de carne de frango

O processo de abate das aves no Brasil está estabelecido através do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA), no Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves - Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998 (BRASIL, 1998) e Portaria nº 74, de 07 de maio de 2019 (BRASIL, 2019). Em geral, nas empresas brasileiras o fluxo é composto pelas etapas de pendura, insensibilização, sangria, escaldagem, depenagem, evisceração, pré-resfriamento, resfriamento, gotejamento, classificação, embalagem, sala de cortes e congelamento (OLIVO, 2006), conforme ilustrado na Figura 2.5. Fluxograma das principais etapas de processamento de aves.

Figura 2.5. Fluxograma das principais etapas de processamento de frangos.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

As principais etapas do processamento estão indicadas na Figura 2.4. As etapas indicadas pela cor cinza, no fluxograma correspondem as etapas iniciais do processo, desde o

recebimento das aves vivas até a etapa de depenagem, estas etapas devem ser segregadas fisicamente no abatedouro (frigorífico) até este ponto, onde logo após a etapa da depenagem, em geral, tem-se um chuveiro de lavagem das aves, e estas seguem para as próximas etapas.

O processo inicial se dá na chegada do caminhão na área de recepção, onde é realizada a pesagem e destinado para uma área, normalmente chamada de galpão de descanso ou espera, onde é realizada a conferência dos documentos oficiais e de romaneio das aves (BRASIL, 1998). Em geral, as aves são recebidas em caixas plásticas ou módulos, em caminhões. Após o tempo de espera, o caminhão é dirigido para a área da pendura, onde as caixas são retiradas e abertas, depositando as mesmas em esteiras para retirada e pendura das aves, sendo a mesma realizada manualmente, geralmente, pendurando as aves pelas pernas em ganchos, iniciando o processo de abate na linha de produção (OLIVO, 2006). As aves passam pelas etapas de insensibilização e sangria de acordo com os métodos previamente aprovados pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), garantindo que todas as operações sejam realizadas de forma contínua (BRASIL, 1998).

As aves podem ser insensibilizadas por dois métodos: atordoamento elétrico ou atordoamento a gás. No primeiro caso, as aves são penduradas e depois insensibilizadas e, no segundo caso, a insensibilização acontece antes da pendura. Na insensibilização por eletronarcose, ou atordoamento elétrico, o equipamento deve possuir registros de voltagem e amperagem, o qual pode ser ajustado de acordo com a espécie, o tamanho e o peso das aves; considera-se também a extensão que será percorrida durante a imersão (Portaria nº.210, de 10 de novembro de 1998). Ressalta-se que esse processo não deve, jamais, promover a morte das aves. Pode-se ainda, o abate sem prévia insensibilização apenas para atendimento de preceitos religiosos ou de requisitos de países importadores (Portaria nº.210, de 10 de novembro de 1998), como por exemplo, abate Halal, realizado por muçulmanos, através de um corte realizado no pescoço da ave (OLIVO, 2006).

Após insensibilização, segue a etapa de sangria. A operação de sangria deve ser realizada com as aves presas pelos pés, em ganchos, apoiados em trilhagem aérea. O comprimento do túnel de sangria consiste no percurso feito pela ave, no tempo mínimo exigido para uma sangria total de três (03) minutos, para só assim ser autorizada outra etapa da operação. Deve-se considerar também o tempo que as aves permanecem penduradas pelos pés, antes da sangria, para que haja fluxo de sangue à cabeça. A partir da sangria, todas as operações devem ser feitas de forma contínua, não podendo ser feito o retardamento ou o acúmulo de aves em nenhuma das etapas para reduzir a contaminação.

Então, as aves seguem para uma etapa de escaldagem em tanques com água quente para promover a remoção das penas nas depenadeiras. A Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998 prevê que a escaldagem deve ser realizada em instalações específicas, separadas das demais áreas operacionais por meio de paredes. Outras características relevantes quanto a esse procedimento são que o ambiente deve ter ventilação suficiente para exaustão do vapor d'água resultante do processo de escaldagem. A escaldagem deve ser efetuada após o término da sangria, sob condições definidas de temperatura e tempo, ajustados às características das aves em processamento. As aves poderão ser escaldadas pelos seguintes processos: por pulverização de água quente e vapor; por imersão em tanque com água quente; por outro processo aprovado previamente pelo DIPOA. Deve-se ter controle de temperatura e renovação continuada de água (Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998). A escaldagem das aves pode ser realizada de forma branda (51 a 54 °C por 90-120 s) ou severa (59 a 64 °C por 30-75 s). Na etapa de escaldagem, ocorre o afrouxamento das penas. As etapas de escaldagem, e na sequência, depenagem são bem importantes para a remoção de toda sujidade e contaminação que vieram nas penas das aves.

A depenagem deve ser realizada de forma mecanizada, com as aves suspensas pelos pés e processadas logo após a escaldagem, não sendo permitido o seu retardamento. As depenadeiras são formadas por conjuntos de dedos de borracha que rotacionam em alta velocidade, removendo as penas através do contato dos dedos de borracha com as aves. Não é permitido o acúmulo de penas sobre o piso, sendo necessária a presença de uma canaleta para o transporte das penas até o exterior da área destinada a esse fim (Portaria nº. 210, de 10 de novembro de 1998). Após esse procedimento, é necessário realizar a revisão e retirada manual das penas que ficaram na carcaça (OLIVO, 2006). Sendo esta uma etapa crítica de contaminação, onde os micro-organismos contidos nas penas podem contaminar a pele. Em todas as etapas, necessita-se de lavatórios acionados por meio de pedal, com esterilizadores de fácil acesso ao operador e assim garantir as boas práticas de fabricação (BPF) (Portaria nº.210, de 10 de novembro de 1998). Sobre os procedimentos adotados tem-se que antes da evisceração, as carcaças são lavadas em chuveiros de aspersão com água sob adequada pressão, com jatos orientados no sentido de que toda a carcaça seja lavada, inclusive os pés.

Nas etapas seguintes, inicia-se a etapa de evisceração das aves, onde as aves são evisceradas por meio do corte na cavidade abdominal e cloaca para a remoção das vísceras. Esta etapa é muito crítica no processo, pois quaisquer rompimentos de vísceras, provocará a contaminação microbiológica das carcaças. As aves são evisceradas em equipamentos automatizados (extração de cloaca, extração de papo e traqueia, corte abdominal e eventração)

e passam por pontos de inspeção sanitária, repasses e lavagem antes do resfriamento. Após essa etapa, as aves passam a ser chamadas de carcaças. A Portaria nº. 210 (1998) descreve que a evisceração deve ser realizada em instalações próprias, isoladas das áreas de escaldagem e depenagem, compreendendo atividades desde o corte do pescoço até a parte final das carcaças. Ao final da etapa de evisceração, tem-se também uma etapa de lavagem das carcaças com água sob pressão. A coleta só pode ser efetuada mediante liberação das aves pela Inspeção Federal (SIF), a qual deve respeitar todos os princípios de higiene recomendados. O produto deve ser resfriado logo após a coleta, com temperatura máxima de 7 °C, a manutenção da cadeia do frio a partir deste ponto de processamento é de suma importância para retardar o crescimento de micro-organismos mesófilos, os quais englobam as Enterobactérias.

As carcaças então seguem para o processo de resfriamento em água, em tanques sequenciais para o resfriamento abaixo de 7 °C. O resfriamento das carcaças de frango pode ser realizado pela imersão das carcaças em tanques de água com resfriamento contínuo, tipo rosca sem fim ou por resfriamento a ar, por câmaras frigoríficas, com ou sem aspersão, ou ainda, por um sistema combinado. Essas operações são supervisionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF), responsável por realizar as inspeções *ante-mortem* (no recebimento das aves) e no *post-mortem* (na evisceração), de forma a garantir o processamento das aves dentro dos padrões de qualidade e segurança sanitária.

Conforme preconizado na portaria nº. 210, o pré-resfriamento pode ser realizado por aspersão de água gelada, imersão em água por resfriadores contínuos, resfriamento por ar, ou ainda outros processos aprovados pelo DIPOA. As indústrias brasileiras, quase na sua totalidade, resfriam as aves em tanques de inox preenchidos com água e gelo, onde as carcaças são colocadas e transportadas por um sistema de rosca sem fim, sendo esse equipamento denominado de *chiller*. Existem alguns métodos para realizar o resfriamento de carcaças de frangos, entre eles o resfriamento em imersão em água gelada (CARCIOFI; LAURINDO, 2007). Tem ainda o resfriamento por meio do *air chiller*, que se dá pela ação do ar gelado. No sistema de pré-resfriamento por aspersão ou imersão por resfriadores contínuos, a água utilizada deve apresentar os padrões de potabilidade previstos no RIISPOA de 2017 e no Decreto nº.10648/2020, onde não se permite a recirculação da água. A temperatura da água do sistema de pré-resfriamento por imersão não deve ser superior a 4 °C. Nos tanques de pré-resfriamento por imersão com emprego de etanoglicol, amônia e/ou similares, a renovação deve ser igualmente contínua e com água gelada. A água de renovação do sistema de pré-resfriamento por imersão poderá ser hiperclorada, permitindo-se no máximo 5 ppm de

cloro livre (BRASIL, 1998). A temperatura da água nos locais de entrada e saída das carcaças não deve ser superior a 16 °C e 4°C, respectivamente, no primeiro e último estágio, observando-se o tempo máximo de permanência das carcaças no primeiro, de trinta minutos. Os tanques que compõem o sistema de pré-resfriamento contínuos por imersão devem ser esvaziados totalmente, individualmente, limpo e desinfetado pelo menos nos intervalos dedicados a higienização pré-operacional, conforme descrito pela Portaria n°.74, de 7 de maio de 2019. A temperatura das carcaças no final do processo de pré-resfriamento, deve ser igual ou inferior a 7 °C. Tolerância de 10 °C, para as carcaças destinadas ao congelamento imediato. Em sistemas de pré-resfriamento devem ter equipamentos que permitam controlar e registrar a temperatura da água no tanque e nos pontos de entrada e saída das carcaças (BRASIL, 1998).

Resfriamento é todo o processo de refrigeração e manutenção da temperatura entre 0 °C (zero grau centígrado) a 7 °C (quatro graus centígrados positivos) dos produtos de aves (carcaças, cortes ou recortes, miúdos e/ou derivados), com tolerância de 1 °C (um grau) medidos no interior dos mesmos (BRASIL, 1998).

Todo o processo é muito susceptível a contaminação microbiológica, uma vez que na própria linha de processamento desde o abate existem pontos críticos, como a escaldagem, depenagem, toda a linha de evisceração e os tanques de resfriamento em água (*chillers*), nos quais podem ocorrer contaminações cruzadas entre as carcaças. A etapa de resfriamento das carcaças, é muito importante para a segurança e qualidade do produto, diminuindo a temperatura da carcaça e reduzindo a taxa de crescimento de micro-organismos.

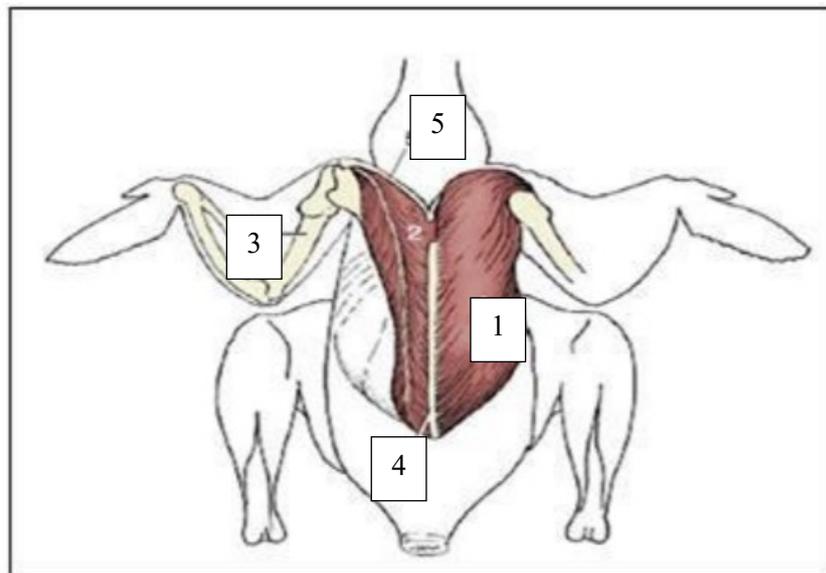
2.3.2 Peito de frango

As carcaças resfriadas seguem para as etapas de cortes, onde os principais cortes são separados, podendo haver as etapas de remoção de pele e osso para cada um dos cortes. Esta etapa de separação dos cortes é realizada em ambiente refrigerado (até 12 °C), e é muito crítica para as contaminações, por manipulação de utensílios e esteiras de transporte.

A composição centesimal da carne de frango varia com o corte analisado. Para o peito de frango sem pele e sem osso, em média, a cada 100 gramas de parte comestível obtém-se 22 gramas de proteínas e 3 gramas de lipídios. O valor de umidade é de 75 % (FRANCO, 2004). Dos cortes de frango, o filé de peito de frango (o músculo *Pectoralis Major*) é bastante popular devido ao alimento ser rico em proteínas, com baixo teor de gordura e a conveniência de uma porção de carne 'desossada'. Conforme descrito por Dyce, Sack e Wensing (2004), o

músculo *Pectoralis Major* (músculo peitoral) está localizado ao rádio e seu tendão para subcutaneamente sobre a superfície do crânio dorsal da articulação do carpo, terminando na extremidade proximal do osso metacárpico originado na quilha do esterno e clavícula conforme demonstrados na Figura 2.6.

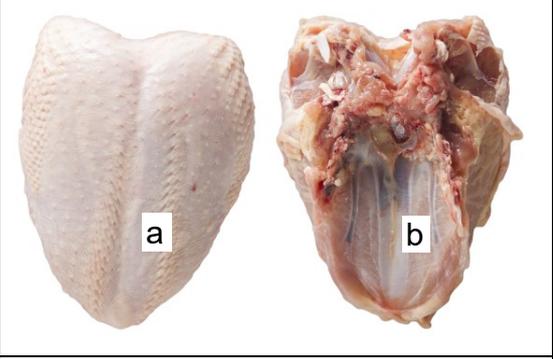
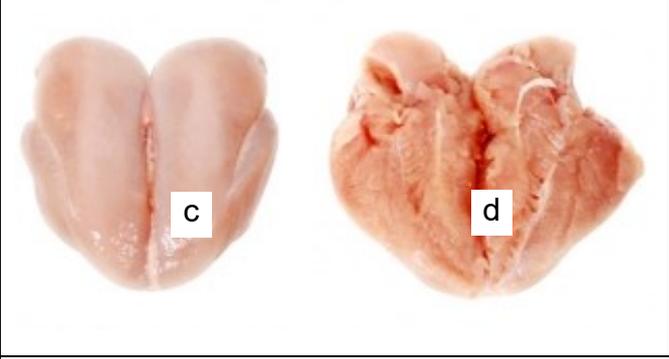
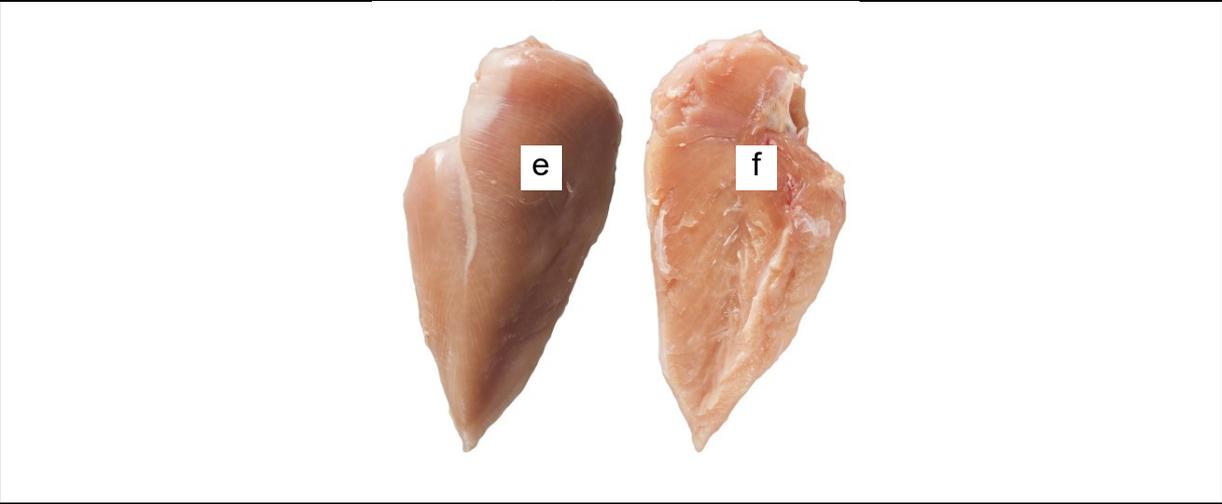
Figura 2.6. Localização anatômica do peito de frango: músculo *Pectoralis Major* (1), supracoracoideus (2), úmero (3), esterno (4) e clavícula (5).



Fonte: DYCE, SACK e WENSING, 2004.

O músculo peitoral maior é o principal responsável pela força do movimento rítmico do bater de asas coordenado, sendo caracterizado como um músculo de rápida contração. Apresenta como a maioria dos músculos, as proteínas de contração actina e miosina, além de suas proteínas associadas, conferindo ao músculo na sua totalidade a aparência estriada (DYCE, SACK e WENSING, 2004). O filé de peito, que é o pedaço de carne do frango, mais magro, quando sem pele, contém apenas 2% de lipídios. Além disso, as gorduras que trazem são de boa qualidade, visto que se trata em grande parte de gorduras mono e poli-insaturadas (OLIVO, 2006). Na sequência, é apresentada a Figura 2.6, que ilustra a sequência, de corte, desossa e remoção da pele, desde o peito de frango com osso e com pele (representando pelas letras, a e b), até o filé de peito de frango sem osso e sem pele (c e d), e suas metades (representando pelas letras, e e f).

Figura 2.7. Imagens peito de frango e as diferentes formas de apresentação.

	
<p>Peito de frango com osso e com pele (a) superfície superior <u>com pele</u> (b) superfície inferior <u>com osso</u>.</p>	<p>Peito de frango sem osso e sem pele (c) parte externa – superfície superior (d) parte interna – superfície inferior.</p>
	
<p>Filé de peito de frango sem osso e sem pele, metades (e) parte externa – superfície superior (f) parte interna – superfície inferior.</p>	

Durante as etapas de corte, desossa e remoção da pele, é um desafio para os colaboradores quando o corte é realizado de forma manual. Bem como, nos equipamentos ainda mais automatizados, tem-se a etapa final de finalização da padronização dos cortes, que em geral é realizada de forma manual com auxílio de facas e/ou tesouras. É durante estas operações que podem ocorrer as contaminações microbiológicas, pois ambas as superfícies do peito de frango, (e) superior e (f) inferior, entram em contato com as tábuas e mesas de corte, esteiras de transporte, além das mãos e utensílios dos colaboradores durante a etapa de corte e apara.

A carne é uma organização complexa de músculo esquelético, tecido conjuntivo e gordura, resultante de reações físico-químicas que ocorrem no tecido muscular a partir do

abate, ou mesmo antes, e que determinam a qualidade final do produto (MEAD, 2004). As fibras musculares podem ser vermelhas, intermediárias e brancas, sendo que a diferença entre elas é a resposta em relação à contração muscular. Quanto mais claras e mais rápida é a contração em relação às mais escuras, que é mais lenta e tônica. O tecido muscular esquelético é formado por feixes de células muito longas, cilíndricas e multinucleadas, chamadas fibras musculares esqueléticas. No músculo, os feixes de fibras musculares estão envolvidos por uma membrana externa de tecido conjuntivo, o epimísio. Cada fibra muscular, por sua vez, é envolvida por uma camada muito fina de fibras reticulares, formando o endomísio. A fibra muscular é delimitada por uma membrana, o sarcolema, e seu citoplasma apresenta-se preenchido principalmente por fibras paralelas, as miofibrilas (MEAD, 2004).

O frango é a única espécie conhecida que possui músculos com cores extremas: o peito possui cor rosa pálida, enquanto a porção da coxa e sobrecoxa possuem coloração vermelha intensa, *in natura*. Essas duas substâncias são proteínas, principalmente a mioglobina, que estão associadas ao oxigênio, o que denota na alteração da cor da carne; ressalta-se ainda que a pigmentação da carne de frango é influenciável pela presença ou não de carotenoides na alimentação. A cor apresentada pela carne de frango possui um papel relevante no que confere a qualidade sensorial da carne, enfatizando como o principal elemento a ser apreciado no ato da compra, variando de cinza até o vermelho com palidez. Os parâmetros utilizados na avaliação da cor da carne estão referenciados no sistema colorimétrico CIELab (The Commission Internationale de L'Eclairage) e suas escalas de cor: luminosidade, representada por L^* , cor vermelho, representado por a^* , e cor amarelo, representado por b^* (VENTURINI et al., 2007).

A cor da carne depende dos fatores intrínsecos e extrínsecos, mas principalmente, da quantidade de mioglobina presente, a qual varia de concentração dependendo da espécie e músculo (SHIMOKOMAKI et al., 2006). A cor observada na superfície das carnes é o resultado da absorção seletiva da luz pela mioglobina e por outros importantes componentes, como as fibras musculares e suas proteínas, sendo também influenciada pela quantidade de líquido livre presente na carne, sendo assim, a cor da carne de frango é influenciada por inúmeros fatores de produção, manuseio e processamento. As alterações da cor da carne são variáveis que dependem do processamento e das condições de armazenamento. A aparência da carne é uma das primeiras características observadas pelos consumidores, sendo a cor um importante atributo de qualidade que influencia a aceitação do consumidor na compra da carne de frango e, geralmente, os consumidores rejeitam aquela carne que não possui uma pigmentação esperada. A cor da carne pode sofrer alterações de acordo com a espécie, e pode

estar associada à atividade física do animal. Apesar de os métodos antimicrobianos serem estudados como tratamentos de intervenção para prolongar a vida de prateleira e controlar patógenos, geralmente pesquisadores apenas avaliam o crescimento microbiano e prestam menos atenção aos efeitos causados pelos antimicrobianos à cor (PETRACCI & FLETCHER, 2002).

CAPÍTULO 3 - Luz Pulsada para Inativação de *Salmonella* em meio de cultura

Neste capítulo é apresentado o artigo intitulado “Effective Pulsed Light Treatments for Inactivating *Salmonella enterica* Serotypes”, submetido à revista Food Control.

O objetivo deste capítulo é apresentar a avaliação da inativação de diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*Typhimurium*, *Enteritidis*, *Heidelberg* e *Minnesota*) aplicando luz pulsada, observando especificamente como os parâmetros de comprimento de pulso e a tensão podem afetar a eficácia do tratamento em meio sólido.

Os experimentos deste capítulo da tese foram planejados para realizar a inativação da bactéria *Salmonella* por luz pulsada em um meio de cultura, para cada sorovar da bactéria *Salmonella enterica* subsp. *enterica* individualizada e na forma de uma mistura, denominado coquetel. O meio de cultura sólido foi utilizado como forma de mimetizar uma superfície de um alimento com uma contaminação superficial. Os experimentos em meio de cultura foram delineados de modo a obter as curvas de letalidade de cada sorovar da bactéria *Salmonella enterica*, frente ao tratamento por luz pulsada com diferentes valores de fluência (J/cm^2), fruto das combinações dos parâmetros de tensão elétrica (V) e o comprimento dos pulsos de luz (μs). Estes experimentos foram realizados durante o período do Doutorado Sanduíche (PDSE) no laboratório de Food Science na Universidade de Cornell, com auxílio e orientação da prof. Dra. Carmem Moraru, Dr. Yifan Chen e Dra. Rachel Alessandra Cheng.

Em julho 2019, parte do conteúdo do capítulo 03 foi apresentado pela autora como Poster na sessão científica “P3 - Meat, Poultry and Eggs (P3-218) - The Effect of Pulsed Light Energy Delivery Mode on Inactivating *Salmonella* spp. in Vitro” (ID# 20987)” no Congresso Internacional IAFP (International Association for Food Protection) 2019 em Louisville, Kentucky (USA).

3. Effective Pulsed Light Treatments for Inactivating *Salmonella Enterica* Serotypes

ABSTRACT

Pulsed Light (PL) is a nonthermal treatment that kills microorganisms by exposing them to short-duration pulses of high-intensity broad-spectrum light. This study evaluated the PL inactivation of different serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, and Minnesota) specifically assessing how pulse width and voltage can affect treatment effectiveness. Bacterial suspensions were spread onto solid agar, used as a model food surface, then treated with PL at different treatment parameters (voltage, pulse width and fluence). Survivors were recovered, enumerated and survivor ratios determined. The Weibull model was used to characterize inactivation kinetics. Three independent replicates were performed for all treatments, and data was analyzed statistically. The results with *S. Typhimurium* highlight that the inactivation effectiveness of PL treatment can be increased by selecting the right combination of parameters within the practical limitations of the equipment. Higher voltages deliver more energy with pulse width, i.e., a higher irradiance, resulting in a more lethal process. PL was very effective for the inactivation of *Salmonella*, and a 6 to 7-log reduction was achieved for all four serotypes and their cocktail mix, after a single light pulse with a fluence of 338 mJ/cm² and 280 mJ/cm², at 2500 V (200 μs) and 3000 V (100 μs), respectively. The results demonstrated similar log reduction for individual serotypes and the cocktail. Higher voltages deliver more energy in the same pulse width, i.e., a higher irradiance, resulting in a more lethal process for *Salmonella*.

3.1 INTRODUCTION

Salmonella spp. human infection from food products is a major source of sporadic gastroenteritis. In recent years, *Salmonella* outbreaks were caused by various food products, including red onions, salads, cucumbers, pre-cut melon, poultry, eggs, pistachios, raw tuna, and sprouts (CENTER FOR EMERGING & INFECTIOUS DISEASES, 2018; HUANG, 2018). Food contamination by pathogenic *Salmonella* can occur at any step of the food production chain: livestock feed, food processing or distribution, and retail (PANZENHAGEN et al., 2018). *Salmonella* is a Gram-negative rod-shaped bacillus from the family Enterobacteriaceae, with more than 2600 serotypes. *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* are the serotypes most commonly associated with human clinical cases of salmonellosis (MUKHOPADHYAY & RAMASWAMY, 2012a; SCALLAN et al., 2011). The emergence

of other serotypes, such as *S. Heidelberg*, *S. Minnesota*, *S. Oranienburg*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, and *S. Kentucky* have raised serious concerns for the food industry (BELL & KYRIAKIDES, 2009; FÀBREGA & VILA, 2013; FOLEY et al., 2011).

Salmonella is effectively killed by heat. However, its effective control in food commodities that are typically consumed raw (e.g., fruits and vegetables), as well as ready-to-eat meats, salads, and pre-cut fruit, which are susceptible to cross-contamination with *Salmonella* during processing, remains a challenge. Besides heat, an alternative strategy for microbial control is chemical decontamination, which was reported to inactivate about 1 to 2 logs of *Salmonella* on fresh-cut produce. Similar results were observed by chemical decontamination of *S. Typhimurium* on chicken skin and *S. Montevideo* in tomatoes (YORK, 2005, MUKHOPADHYAY & RAMASWAMY, 2012). Nonetheless, since chemical sanitizers are not always desirable, there are significant efforts to identify nonthermal inactivation alternatives that can effectively kill foodborne pathogens, including *Salmonella* (CAO et al., 2017; MAÑAS & PAGÁN, 2005; MUKHOPADHYAY & RAMASWAMY, 2012), without detrimental effects on the product or for the consumer. Treatments such as UV-light, pulsed light (PL), cold plasma, ultrasound, and high-pressure processes were reported before as effective control measures against foodborne pathogens. Although a significant reduction of *Salmonella* was achieved by these technologies when used alone or in combination, in most cases, they did not result in a satisfactory inactivation of this pathogen (MUKHOPADHYAY & RAMASWAMY, 2012). Thus, further investigation of these technologies, optimization of their parameters and a deeper mechanistic understanding are required to improve their effectiveness.

PL is used to decontaminate food products, food contact materials, liquids, and medical devices from bacteria, yeasts, molds, and viruses by applying high-intensity light for very short periods (below 1 ms) (MORARU, 2011b; ROWAN et al., 1999). The key element of a PL unit is the flashlamp, which is filled with inert gas, typically xenon (MORARU, 2011). PL lamps emit polychromatic light with a broad spectrum of wavelengths, from 200 to 1100 nm, which includes the germicidal UV-C light (ELMNASSER et al., 2007; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2005; MORARU, 2011; MUKHOPADHYAY & RAMASWAMY, 2012; PEDRÓS-GARRIDO et al., 2018). The most critical parameters that affect PL treatment efficacy are fluence (incident energy per unit surface area), electric voltage applied to the light

source, pulse width, number of pulses, pulse power, and irradiance (MACGREGOR et al., 1998; ROWAN, 2019).

Fluence is the most widely used parameter for characterizing PL treatment. Accurate quantification of fluence is critical for making meaningful comparisons among treatments, concluding about PL effectiveness, and adequately designing industrial processes (HSU & MORARU, 2011). Several reports suggest that PL efficacy is greater than continuous low-pressure UV irradiation due to the high peak power (LEVY et al., 2012). Thus, the same energy delivered content may achieve different treatment effectiveness, depending on the irradiance (fluence per unit time or pulse power per unit surface area). A higher PL voltage can shift the spectral distribution of energy towards lower wavelengths, increasing the proportion of UV-C energy (SCHAEFER et al., 2007). For electric voltages ranging from 1000 to 3000 V, the percentage of UV-C in PL has been shown to decrease while decreasing input voltage (LEVY et al., 2012). The different proportions of UV-C in PL emitted at different voltages can impact the germicidal effect of the treatment. Artiguez et al. (2011) tested the efficacy of PL treatment for different lamp discharge voltages for inactivation of *Listeria innocua* in a liquid medium, and showed that the higher the voltage, the faster the inactivation. Food composition, surface properties, product thickness, optical properties, and initial contamination are other important factors that affect the efficacy of PL in food decontamination (BHAVYA & HEBBAR, 2017; GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007). For example, although PL can inactivate *Salmonella* in food, solids, and liquids. Different levels of killing effectiveness have been reported, depending on the substrate and treatment conditions (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007; HILTON et al., 2017; LUKSIENE et al., 2009).

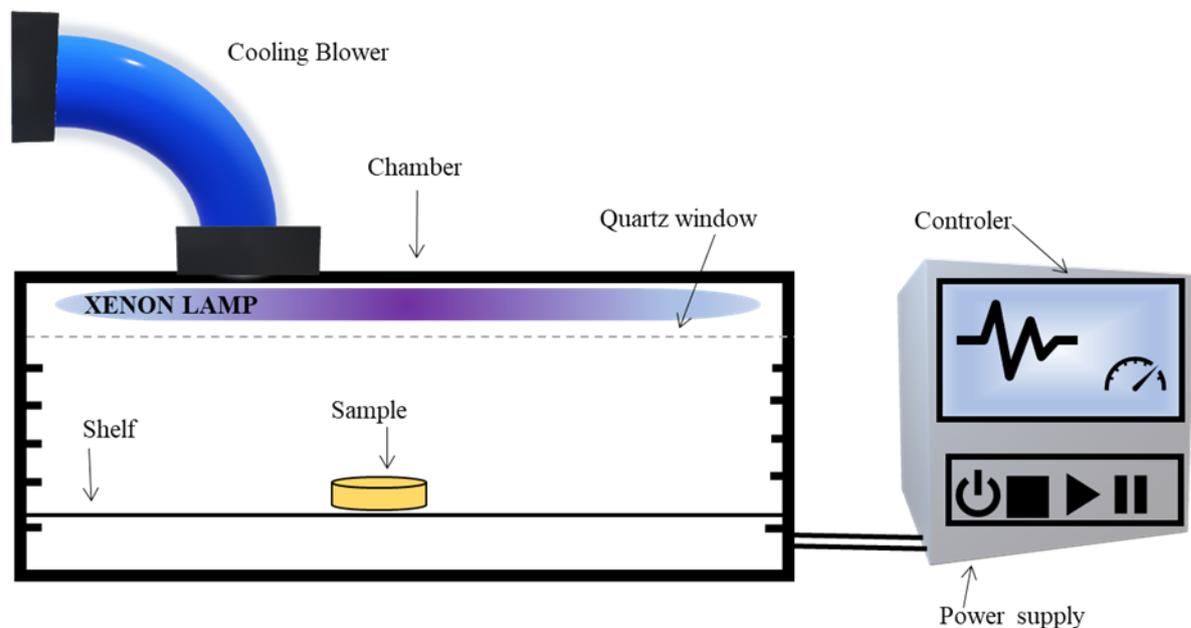
To further understand how various PL treatment parameters affect inactivation, this work focused on investigating the efficacy of PL treatment at a range of input voltage, pulse widths, fluence, and irradiance levels. The fluence level per pulse was selected by varying the pulse width and voltage, at the same position within the PL chamber. Four serotypes of *S. enterica* subsp. *enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, and Minnesota) and a cocktail of these serotypes were used as challenge microorganisms. The treatments were conducted on solid agar media, which mimicked a smooth and homogeneous food surface.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 Pulsed Light system

PL treatments were conducted in a laboratory-scale benchtop PL system (XENON Model X-1100, Xenon Corporation, Wilmington, MA, USA), shown in the schematic diagram in Figure 3.1. This PL equipment allowed for modification of the voltage, pulse width, and the number of pulses. The stainless-steel chamber had an internal shelf for placing samples at different distances from the lamp. The PL treatments were performed at room temperature ($\sim 21\text{ }^{\circ}\text{C}$) with samples placed at the shelf center, 13 cm from the lamp.

Figure 3.1. Schematic diagram of the PL unit with a treatment chamber and the power supply energizing a xenon lamp.



The fluence reaching the sample for each pulse was measured using a detector reader (Ophir Optronics Inc., Nova II display, USA) and a pyroelectric head (Ophir Optronics Inc., L40 150 A, USA) placed on the shelf at the exact spot as the samples during treatment. All fluence measurements were performed in triplicate.

3.2.2 Bacterial suspensions

Four different serotypes of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, and Minnesota from the environment, chicken, and avian sources) were kindly provided by the Food Safety Laboratory at Cornell University (Ithaca, NY, USA). All strains were maintained in a culture stock at -80 °C in TSB (BBL™ Trypticase™ Soy Broth, BD, USA) with 20% v/v glycerol. One loop from the stock culture was streaked on TSA (BBL™ Trypticase™ Soy Agar, BD, USA) and incubated at 37 °C for 24 h. Then, one single colony was transferred to 5 mL of TSB and incubated at 37 °C with aeration (210 rpm) for 24 h. From the TSB bacterial culture, 5 µL of cultures at the stationary phase were sub-cultured into 5 mL of TSB at 37 °C with aeration (210 rpm) for 16 h, reaching the stationary phase at 10^8 to 10^9 CFU/mL.

The culture tubes were centrifuged for 5 min at 5500 rpm (16500 x g) and 21 °C (Beckman, Avanti J-25, USA). Then, supernatants were removed, and the pellets were resuspended with 5 mL of phosphate buffer solution (PBS, Weber DB™, Weber Scientific, USA) for 30 s under vortex agitation (Digital vortex mixer, Fisher Scientific, USA).

For experiments with a cocktail mix, 2 mL from each of the four *Salmonella* PBS suspensions were combined in a fresh culture tube and mixed for 30 s under vortex agitation. Ten-fold dilution series were prepared for all experiments for enumeration purposes and PL inactivation experiments. The bacterial suspensions previously described were serially ten-fold-diluted from 1 to 10^1 until 1 to 10^8 , and 50 µL of each dilution was spread-plated on a trypticase soy agar plate (60 mm diameter, 1 cm thick).

3.2.3 Inactivation procedure and microbial enumeration

Five minutes after spreading the inoculum, PL treatment was applied to each agar plate of the dilution series individually. PL treatment was performed with one pulse of light over the inoculated Petri dish placed at the center of the chamber at 13 cm from the light source by applying 50 to 420 µs of pulse light width in 2000, 2500, and 3000 V of discharge voltage. Inoculated but non-PL-treated agar plate was prepared as the control for the corresponding PL-treated plate at each dilution. *Salmonella* initial counts (N_0) and survivor counts (N) were obtained by enumeration after incubation at 37 °C for 24 h. The limit of detection (LOD) of this microbial enumeration was 1 colony-forming unit (CFU) per plate,

allowing for a maximum detectable log-reduction of 8. All experiments were performed in triplicate.

3.2.4 Kinetic modeling

The Weibull model (Equation 1) was used for describing PL inactivation as a function of fluence (F) (DE MORAES; HILTON; MORARU, 2020; WOODLING; MORARU, 2007).

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -bF^n \quad (1)$$

in which b and n are scale and shape parameters, respectively.

3.2.5 Statistical analysis

The statistical analysis was performed through a one-way analysis of variance (ANOVA) using Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, USA). Tukey's HSD tests were used for posthoc pairwise comparisons, and differences were considered significant for $p < 0.05$.

3.3. RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 PL treatment parameters

The equipment setup used here allowed the delivery of different fluence levels per pulse in the same position within the PL chamber by using a combination of different pulse widths and voltages. Most earlier studies used equipment with constant pulse width and voltage. Thus, relocation of the sample in the chamber was required to obtain different fluence levels, which changed the light incidence pattern (LEVY et al., 2012). Table 3.1 shows the PL input parameters voltage and pulse width and resulting fluence and irradiance. Irradiance is a critical parameter in PL since this treatment aims to provide a high amount of energy in the shortest possible time. It is suggested that PL efficacy is greater than continuous low-pressure UV irradiation due to the high peak power (LEVY et al., 2012). Thus, the same energy delivered content may achieve different treatment effectiveness, depending on the irradiance (power per unit surface area).

It is noteworthy that we intentionally allowed overlap among the fluence ranges obtained with the three voltage levels to uncover potential differences in bactericidal efficacy

achieved under different voltages (see Table 3.1) since different voltages are known to change the spectral output of the lamp (GÓMEZ-LÓPEZ & BOLTON, 2016). A higher PL voltage has been found to shift the spectral distribution of energy towards lower wavelengths, increasing the proportion of UV-C energy (SCHAEFER et al., 2007). For input voltages ranging from 1000 to 3000 V, the percentage of UV-C in PL has been shown to decrease while decreasing input voltage (LEVY et al., 2012).

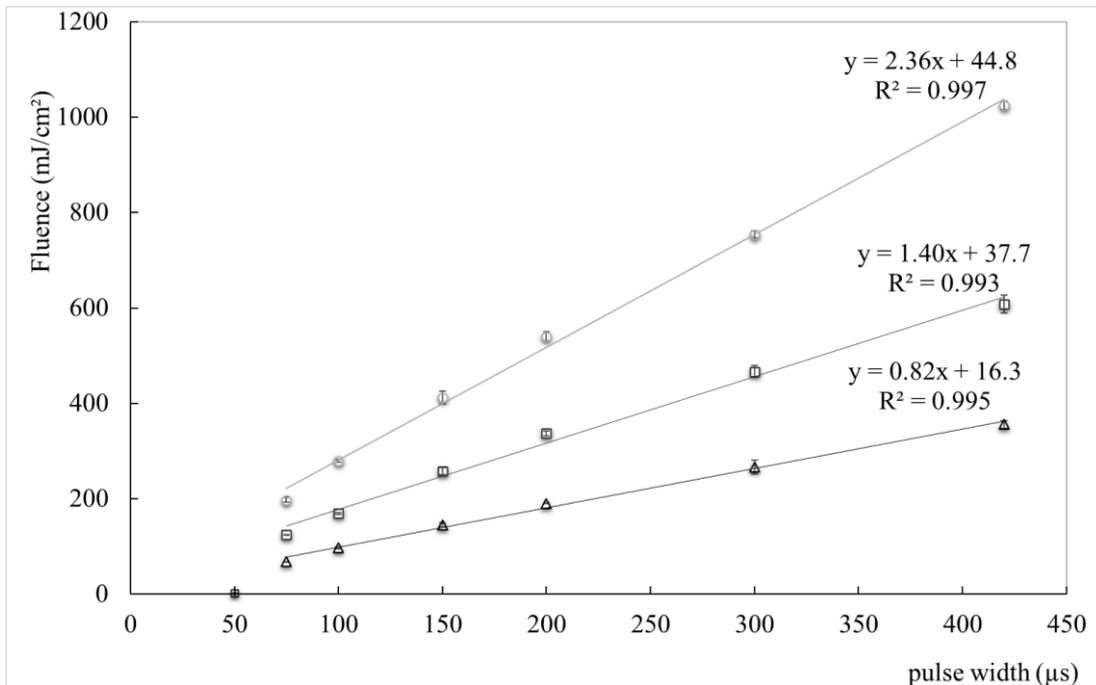
Table 3.1. PL parameters voltage and pulse width and the resulting fluence and irradiance.

Voltage (V)	Pulse width (μ s)	Fluence (mJ/cm ²)	Irradiance (W/cm ²)
2000	50	58*	1160*
	75	68	910
	100	97	970
	150	146	973
	200	191	955
	300	267	890
	420	356	848
2500	50	107*	2140*
	75	125	1700
	100	170	1700
	150	258	1720
	200	338	1690
	300	468	1560
	420	609	1450
3000	50	163*	3260*
	75	198	2600
	100	280	2800
	150	413	2760
	300	756	2520
	420	1030	2450

*Calculated using linear regression extrapolation (probably overestimated)

The fluence dependence on the pulse width for each input voltage applied and the linear relationship ($R^2 > 0.99$ for all three voltages) between these two parameters is shown in Figure 3.2. The fluence values measured for pulses of 50 μs were much smaller than values obtained by extrapolating from the linear regression, attributed to the extremely short pulse duration. The PL system uses a capacitor to accumulate electrical energy, delivered as short light pulses by a source (KRAMER et al., 2017). The small amount of energy produced during a very short pulse may not be appropriately registered during radiometric measurements, depending on the sensitivity of the radiometer used. For this reason, fluence values measured for 50 μs pulse width were not included in the linear regression in Figure 3.2. Thus, the linear regression resulted in slopes of 0.82, 1.4, and 2.4 W/cm^2 and y-intercept values of 16, 38, and 45 mJ/cm^2 in 2000, 2500, and 3000 V, respectively. The slope increased as the applied voltage increased, i.e., the higher the voltage, the easier it is to increase the fluence and irradiance by increasing the pulse width.

Figure 3.2. PL fluence as a function of pulse width at 2000 V (Δ), 2500 V (\square), and 3000 V (\circ), and the respective linear regression for each data set.

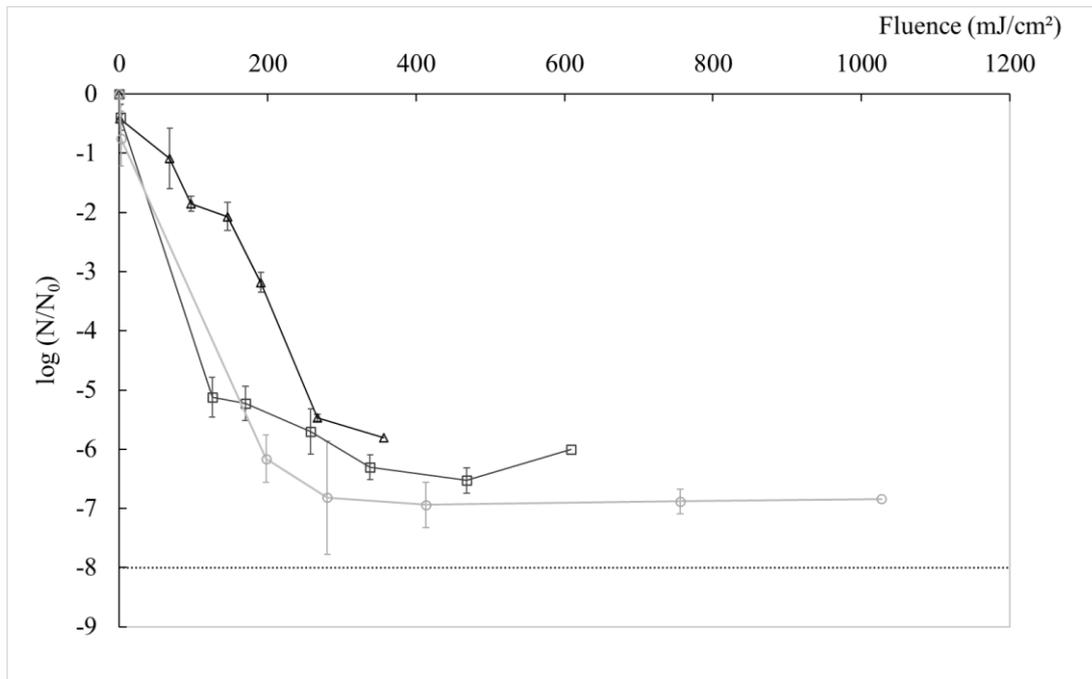


Values are average ($n = 3$), and error bars represent one standard deviation.

3.3.2 PL inactivation of *Salmonella*: treatment and serotype effects

The effect of the PL treatment on the *S. Typhimurium* inactivation is shown in Figure 3.3, which includes the log reduction $\log(N/N_0)$ vs. fluence data at the three different voltages. The inactivation curve observed here is typical of PL treatments, in which a plateau is obtained after a critical fluence level is reached. The plateau indicates a limit of the PL treatment effectiveness for the specific bacteria-medium system, after which inactivation no longer increases with increasing fluence. At the same voltage, the log reduction increased as fluence increased, as expected. However, similar fluence values but higher voltages led to higher log reduction values. For instance, we obtained a 5.23 ± 0.34 log reduction of *S. Typhimurium* at 170 mJ/cm^2 (2500 V and $100 \mu\text{s}$). A much smaller log-reduction (3.18 ± 0.24) was reached using a slightly higher fluence of 191 mJ/cm^2 but a lower voltage (2000 V and $200 \mu\text{s}$). However, a higher log-reduction (6.16 ± 0.46) was observed when using a similar fluence (198 mJ/cm^2) and higher voltage (3000 V and $75 \mu\text{s}$). Higher PL inactivation at higher voltage values was reported before. LEVY et al., (2012) investigated the PL inactivation of *B. subtilis* spores on agar medium at 1000, 1500, and 2500 V and found significantly higher ($p < 0.05$) inactivation levels at 2500 V than at 1000 and 1500 V. The increase in the input voltage results in a higher inactivation, according to Levy et al. (2012). Therefore, it was shown that the fluence level alone could not sufficiently describe the PL treatment. Other PL treatment parameters, such as the voltage and pulse width, need to be specified. Some PL equipment requires more than 50 flashes to achieve a significant inactivation while others only 1 or 2 flashes (RAJKOVIC et al., 2010). Consequently, a comprehensive evaluation of the factors involved in PL efficiency is necessary.

Figure 3.3. *S. Typhimurium* inactivation ($\log(N/N_0)$) as a function of applied PL fluence (mJ/cm^2) at 2000 V (Δ), 2500 V (\square), and 3000 V (\circ).

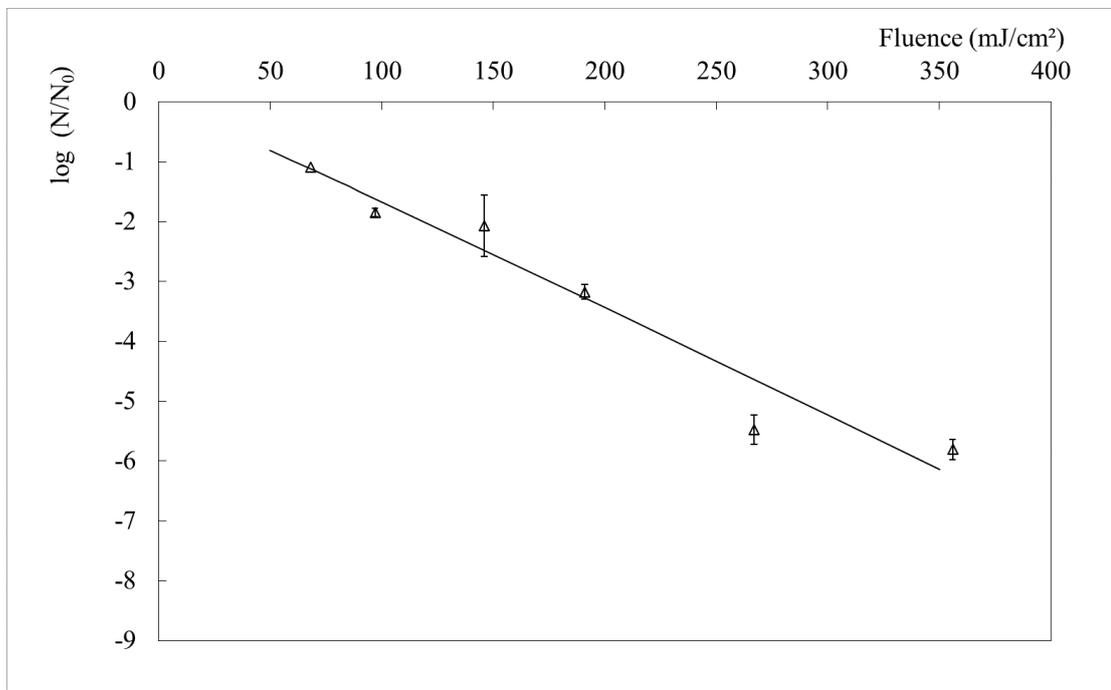


Data points are average of 3 replicates, and error bars one standard deviation. The dashed line (-----) indicates the LOD (limit of detection).

Overall, the findings of this study are consistent with the literature describing PL inactivation for *Salmonella* on agar plates. (PASKEVICIUTE; BUCHOVEC; LUKSIENE, 2011) observed a 5.5 log-reduction of *S. Typhimurium* at $160 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, comparable with $170 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ (2500 V and $100 \mu\text{s}$) that resulted in 5.23 ± 0.34 log-reduction of *S. Typhimurium* in the present work. Levy et al. (2012) performed PL experiments with strains of *S. Enteritidis*; it was observed a 3 and 5 log-reduction with one single pulse with a fluence of 30 and $110 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, respectively. These results are comparable with data in the present work, about 6 log-reduction at $198 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. According to Levy et al. (2012), a log-reduction higher than 5 was obtained in one flash and at fluences lower than $1.8 \text{ J}/\text{cm}^2$ on spores of a range of spore-forming bacteria, of vegetative cells of non-spore-forming bacteria, and on yeasts spread on agar media. (LUKSIENE et al., 2007) achieved a plateau of 7-log reduction of *S. Typhimurium* by PL treatment after 100 light pulses and $1600 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ (1200 V, $133 \text{ W}/\text{cm}^2$, and 5 Hz); however, the PL parameters voltage and number of pulses are very different from those used in the current study.

Figure 3.4 shows a Weibull-type model fitted to the *S. Typhimurium* inactivation ($\log(N/N_0)$) as a function of applied PL fluence (mJ/cm^2) treated at 2000 V. The model fit was good ($R^2 > 0.93$), with the shape factor (n) of 1.04 and b scale parameter of 18.3, indicating a quasi-linear behavior. However, PL treatment data at either 2500 or 3000 V could not be fitted using the Weibull model since the inactivation plateau was reached at very low fluence values (Figure 3.3).

Figure 3.4. Experimental data and fitted Weibull model for the *S. Typhimurium* inactivation ($\log(N/N_0)$) as a function of applied PL fluence (mJ/cm^2) at 2000 V (Δ).



Data are averages of 3 replicates and error bars one standard deviation.

Bacterial log-reduction data after the PL treatment applied to the four *S. enterica* serotypes and the cocktail using 2000, 2500, and 3000 V are presented in Table 3.2. At very low fluence ($0.80 \text{ mJ}/\text{cm}^2$), using 2000 V and $50 \mu\text{s}$, the observed inactivation was lower than 1-log for all serotypes and the cocktail, without significant difference among them. At the other boundary, no significant difference among log-reduction values (6.6 to 7.1 log) for all serotypes and cocktail was observed at relatively high fluences, around $300 \text{ mJ}/\text{cm}^2$, when using $100 \mu\text{s}/3000 \text{ V}$ or $200 \mu\text{s}/2500 \text{ V}$. Only at $191 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ (2000 V and $200 \mu\text{s}$), PL treatment resulted in a log-reduction value significantly higher (around 1-log) for *S. Enteritidis* than the values found for the other serotypes and cocktail. This result suggests

that the *S. Enteritidis* serotype may be more sensitive to the PL treatment at this condition. However, among the other three serotypes and the cocktail, no significant difference was found. Thus, whether *S. Enteritidis* is present in a cocktail of *Salmonella* spp. may not affect the overall inactivation outcome by PL since it is less resistant, and a possible failure would be a safe underestimation of the inactivation.

Table 3.2. *S. enterica* serotypes inactivation as a function of PL treatment voltage, pulse width, and fluence (mJ/cm²). Values are averages \pm one standard deviation (n = 3).

Voltage (V)	Pulse width (μ s)	Fluence (mJ/cm ²)	Log Reduction by PL Inactivation, log(N/N ₀)				
			Typhimurium	Enteritidis	Heidelberg	Minnesota	Cocktail*
2000	50	0.80	-0.42 \pm 0.33 ^a	-0.12 \pm 0.02 ^a	-0.59 \pm 0.44 ^a	-0.24 \pm 0.19 ^a	-0.23 \pm 0.07 ^a
2000	200	191	-3.2 \pm 0.2 ^b	-4.2 \pm 0.1 ^c	-3.3 \pm 0.1 ^b	-3.1 \pm 0.2 ^b	-3.3 \pm 0.4 ^b
2500	200	338	-6.3 \pm 0.4 ^d	-6.7 \pm 0.4 ^d	-6.3 \pm 0.3 ^d	-6.5 \pm 0.3 ^d	-5.9 \pm 0.5 ^d
3000	100	280	-6.8 \pm 0.4 ^e	-6.8 \pm 0.5 ^e	-7.1 \pm 0.2 ^e	-6.6 \pm 0.4 ^e	-7.1 \pm 0.0 ^e

*Cocktail: a mix of the four *S. enterica* serotypes.

Values followed by the same superscript letters in the same row (with the same voltage, pulse width, and fluence values) have no significant differences by the ANOVA one-way Tukey test ($p < 0.05$).

3.4. CONCLUSIONS

PL was effective for the inactivation of four *S. enterica* serotypes (Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, and Minnesota) and a cocktail of them. PL inactivation had increased from 3 to 6-log reduction when the voltage increased from 2000 to 3000 V, keeping a similar fluence level at around 191-198 mJ/cm² for *S. Typhimurium*. Overall, *Salmonella* inactivation reached up to 6 to 7-log reduction for all four serotypes and cocktail mix after only one single light pulse with a fluence of 280 mJ/cm². A very important finding of this study is that PL treatments conducted under similar fluence, but at different voltage and irradiances, resulted in different levels of microbial inactivation. Furthermore, the results demonstrated not significantly different log-reduction values for each serotype and the cocktail. At an intermediary fluence level, *S. Enteritidis* presented a 1-log reduction higher than other serotypes. However, using a cocktail of *Salmonella enterica* serotypes to design the PL

treatment is adequate since the mix followed the more resistant serotypes. These findings suggest that it is feasible and effective to fine-tune PL discharge voltage and pulse width, such that more effective inactivation of bacteria can be achieved while maintaining product quality and saving energy, thus opening up new possibilities for optimizing the PL treatment for a given industrial application.

Acknowledgments

This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and CAPES-PRINT Process - 88881.310374/2018-01 - Foods of vegetable origin: processing and impact on human health. The authors are thankful to Xenon Corporation (Wilmington, MA, USA) for providing the Pulsed Light unit used in the experiments and the Food Safety Lab (Cornell University) for providing the *Salmonella* strains.

CAPÍTULO 4 - Luz Pulsada para Inativação de *Salmonella* em Peito de Frango Resfriado

Neste capítulo é apresentado o artigo “Pulsed Light treatment on fresh chicken breast surfaces: *Salmonella enterica* reduction and quality attributes”, que está em processo de submissão à revista Food Control.

Parte do conteúdo deste capítulo foi apresentado pela autora, na sessão de apresentação oral, no Congresso Internacional, EFFoST – IFT International Nonthermal Processing, em novembro de 2019, na cidade de Monterrey (México) - “Pulsed Light For *Salmonella* Inactivation On Chicken Breast Meat”.

Neste capítulo avaliou-se o efeito de diferentes valores de fluência (J/cm^2), em função da combinação de comprimento de pulso e número de pulsos na redução da concentração do coquetel de *Salmonella* na superfície superior (abaixo da pele), e na superfície inferior (parte do corte do lado do osso) do filé de peito de frango resfriado. Além disso, avaliou-se a qualidade sensorial e de cor na parte superior do filé de frango tratado por luz pulsada.

A parte dos experimentos, referente à inativação de *Salmonella* inoculada nas superfícies do filé de peito de frango foi realizada durante o período do Doutorado Sanduiche (PDSE) no laboratório de Food Science na Universidade de Cornell, com auxílio e orientação da prof. Dra. Carmem Moraru, Dr. Yifan Cheng e Dra. Rachel Alessandra Cheng. Como continuidade dos experimentos no Brasil, foram realizados novos experimentos e produção de amostras na UFSC no Laboratório integrado de engenharia biológica (Lieb) do departamento de Engenharia Química e de Alimentos, com auxílio e orientação da Dra. Jaqueline Moraes e Dr. Bruno Carciofi. As medidas de qualidade (cor) foram realizadas no laboratório de Propriedades Físicas dos Alimentos (PROFI), neste mesmo departamento da UFSC.

4. Pulsed Light Treatment of Chicken Breast Surfaces: *Salmonella enterica* reduction and quality attributes

ABSTRACT

This study evaluated Pulsed Light (PL) treatment for inactivating *Salmonella enterica* inoculated on raw chicken breast meat. A variety of PL parameters - number of pulses (1 to 6), pulse width (420 to 2520 μs), fluence (2.12 to 12.72 J/cm^2), and irradiance (1.96 to 5.05 kW/cm^2) - were used and the consequent *Salmonella* log-reduction determined on the naturally external (top) and internal (bottom) surfaces of the chicken breast fillet after treatment. Also, treated samples were assessed for changes in temperature, color, and sensory attributes. *Salmonella* reduction ranged from 1.18 to 2.33 log on top and from 0.58 to 1.17 log on the bottom surface. The decontamination was dependent on the surface, with a significantly 1 log reduction higher for the smoother (top) surface than the rougher (bottom) surface. Quality attributes such as color and sensory of PL-treated chicken breast were not significantly different from untreated samples. The results indicated that PL could be used in the chicken industry, giving preference for shorter and frequent pulses – consequently higher irradiance – that increase *Salmonella* inactivation at both sides.

4.1 INTRODUCTION

Food safety is a fundamental aspect of global food production and security. *Salmonella enterica* is one of the foodborne pathogens most often associated with infections (BORGES et al., 2017), while chicken, turkey, and eggs account for 28% of the salmonellosis reports in the US (IFSAC, 2020). Poultry processing steps - slaughter, scalding, defeathering, and evisceration - promote the leakage of intestinal contents and feces that are source of *Salmonella* contamination on chicken meat (MEAD, 2004). Noteworthy, the incidence of *Salmonella* increases from pre-chill to post-chill due to cross-contamination in processing equipment (surfaces and conveyor belts) and workers manipulation, impacting the whole poultry carcass and their cuts.

Thermal processing can easily inactivate *Salmonella* (D-value of 0.1 min at 70 °C) (MURPHY et al., 2002). However, raw chicken has a high market share, which requires poultry processors to control foodborne pathogens in those products. Thus, there is a demand

for food processing alternatives to inactivate microorganisms while preserving the overall characteristics of raw food (VAN IMPE et al., 2018).

High intensity Pulsed Light (PL) is a nonthermal food processing method able to multi-log reductions of foodborne pathogens (Mengarda-Buosi et al., 2021) while retaining nutritional and sensory food quality due to minimal processing (DE MORAES; MORARU, 2018). The exposure to PL includes infrared, visible, and ultraviolet radiation that inactivate microbial cells at room temperature (MORARU, 2011). PL is an excellent method of solid and liquid foods, surfaces, and packaging decontamination (GÓMEZ-LÓPEZ & BOLTON, 2016; Hilton et al., 2017; MORAES et al., 2020; MORARU, 2011). PL application for decontaminating food and food contact surfaces was approved in 1996 by the U.S. Food and Drug Administration (FDA). The FDA recommends using xenon lamps with wavelengths between 200 and 1100 nm, up to cumulative 12 J/cm^2 , and pulse width below 2 ms (FDA, 1996).

Several studies demonstrated PL microbial inactivation effectiveness depending on the number of pulses, voltage applied, distance between sample and lamp, spectral range of the light, time between contamination and treatment, type of treated sample, and type and initial concentration of microorganisms (DHAR & CHAKRABORTY, 2020; HEINRICH et al., 2016; MANDAL et al., 2020). Fluence (energy per unit area) is the most common parameter to characterize PL. However, it does not define the treatment effectiveness alone, and irradiance (energy per unit area per unit time) and light spectrum (that depends on the applied voltage) are essential (Levy et al., 2012). Mengarda-Buosi et al. (2021) explored PL treatments with different pulse widths and voltages for *Salmonella* inactivation, which resulted in higher log-reduction levels when increasing the fluence; however, under similar fluences, they observed higher inactivation levels with higher voltages or higher irradiances (shorter pulses).

Light-based technologies have limitations for solid food application due to material opacity and roughness, and temperature rise by the photo-thermal effect from radiation in the infrared region (MANDAL et al., 2020). Solid foods and packaging materials must ideally be clear and smooth for not shading the microorganisms (BHAVYA & UMESH HEBBAR, 2017). PL treatments achieved a high-level microbial inactivation on agar surfaces, up to 7 logs, while it reaches around 1 to 3 log reductions on complex surfaces, such as meat (HEINRICH et al., 2016). Chicken meat surface decontamination by PL was reported as a

function of the dose, distance from the light source, pulse repetition rate, and voltage (PASKEVICIUTE et al., 2011), treatment time, microbial load, packaging (KEKLIK et al., 2010), and type of microorganism (KEKLIK et al., 2012a).

Previous studies observed PL efficacy on reducing *S. enterica* contamination in up to 2.0 log on boneless chicken breast (KEKLIK et al., 2010), 2.0 log on raw chicken meat surface without affecting the sensory attributes using 5.4 J/cm² (PASKEVICIUTE et al., 2011), and 0.9 to 3.0 log on raw chicken fillets at 1.25 to 18.0 J/cm² (MCLEOD et al. 2017). However, the literature presents PL treatment only on the so-called top surface, i.e., the external meat surface before removing it from the chicken carcass. There is a concern on inner muscle parts that became exposed to cross-contamination after cutting, such as the chicken breast surface naturally bonded to the carcass (so-called bottom surface). Thus, the present study aimed to investigate PL parameters pulse width, fluence, and radiance affecting *Salmonella enterica* log-reduction and quality attributes instrumental color and sensory when PL was applied to the top and bottom surfaces of raw chicken breast fillets.

4.2. MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Chicken breast fillets samples

Fresh boneless skinless chicken breast fillets were obtained from a local supermarket (Ithaca, NY, USA) at least 5 days before ending their labeled shelf-life and stored in the refrigerator at 4 °C until use. The chicken surfaces were designated as the top side surface (the muscle that was closer to the skin) (Figure 4.1a) and the bottom side surface (the inner side that was closer to the bone) (Figure 4.1b). Chicken breast fillets were cut into a round shape (projected surface area of 28.26 cm²) using a petri dish (diameter 6 cm), as presented in Figure 4.1c for the top side surface and in Figure 4.1d for the bottom side surface. The petri dish was used for holding the samples during PL experiments.

Figure 4.1. Chicken breast fillets images of (a) top side surface and (b) bottom side surface, and chicken breast fillets cut samples of the (c) top side surface and (d) bottom side surface.



4.2.2 Inoculum and inoculation

The inoculum of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* containing four serotypes (Heidelberg, Typhimurium, Minnesota, and Enteritidis) were prepared according to Mengarda-Buosi et al. (2021). The strains came from the Food Safety Laboratory (Cornell University, Ithaca, NY, USA) where they were maintained at - 80 °C in Tryptic-Soy Broth (TSB, BD, USA) with 20% of glycerol in volume. For obtaining the 4-strains cocktail inoculum, each serotype was first prepared individually, as it follows.

One loop removed from the TBS stock culture was streaked on Tryptic-Soy Agar (TSA, BD, USA) for incubation at 37 °C for 24 h. Then, a single colony from the TSA culture was added to TSB (5 mL) for incubation at 37 °C and aeration (210 rpm) for 24 h. Thus, 5 µL were transferred to another TSB (5 mL) and kept at 37 °C and aeration (210 rpm) for 16 h, reaching the stationary phase with 10^8 - 10^9 CFU/mL. Thus, the bacterial culture was centrifuged (5 min, 5500 rpm, $16500 \times g$, 21 °C) and the resulting pellets were resuspended under vortex agitation (30 s) on phosphate buffer solution (5 mL, Weber DB™, Weber Scientific, USA). Finally, 2 mL of each *Salmonella* serotype suspension were added into a sterile tube for vortex agitation (30 s), forming the 4-strains cocktail.

Inoculation was performed by adding ten drops (5 μ L) of the cocktail onto the surface of the chicken breast samples to achieve around 10^6 CFU/cm². After inoculation samples were kept for 15 min in the laminar flow cabinet at room temperature before PL treatment.

4.2.3 Microbial enumeration

Non-treated and PL-treated *Salmonella*-inoculated samples were submitted to microbial enumeration to determine the initial contamination, N_0 , and the surviving number of cells, N , respectively, as described in the following. The natural microbiota present on uninoculated boneless chicken breast fillet was analyzed (negative control) for *Salmonella* presence and enumeration.

Chicken meat samples were transferred to filtered stomacher bags (Nasco, Whirlpak®, Madison, WI, USA), followed by the addition of 30 mL of phosphate buffer solution (PBS, Weber DB™, Weber Scientific, USA) prior to mechanical stomaching (model 400, Seward Ltd., Worthing, UK) for 1 min. Stomached samples were serially diluted in phosphate buffer solution followed by spread-plating 0.1 ml on XLD agar (Xylose Lysine Deoxycholate, BD Difco™, USA) and incubation at 37 °C for 24 h. Finally, *Salmonella* colonies on the XLD plates were enumerated and their concentrations on chicken breast surfaces back calculated, which were expressed in CFU per centimeter square of the sample surface. The limit of detection of this method is 10 cells per plate (for each dilution). The log-reduction value of each treatment was estimated by $\log_{10}(N/N_0)$.

4.2.4 Pulsed Light treatment

A bench-top PL system (X-1100, Xenon Corporation, USA) comprising of a control unit, a treatment chamber, and a blower lamp housing unit was used for the experiments. A linear Xenon flash lamp (LH-840) could deliver high-intensity noncollimated white light (240–1,100 nm) using a maximum voltage of 3000 V. A quartz window protected the lamp, and the housing lamp was connected to an air blower to prevent the lamp from overheating.

The energy received by the target sample in each pulse was measured using a radiometer equipped with a detector reader Nova II display (PE50 Ophir Optronics Solutions Ltd., Ophir Optronics Inc., Wilmington, MA) with a pyroelectric head (model L40 150 A). It was measured the energy delivered for a single pulse of varying pulse width (420, 1260, and

2520 μs) at 3000 V with the radiometer head positioned at 4.6 cm from the lamp. This distance sample-radiometer head was the same further used for placing the chicken samples in the inactivation experiments. When more than one pulse was applied, the fluence value was estimated by directly multiplying the number of pulses and one pulse fluence. The irradiance of each pulse was expressed as radiance energy in kW/cm^2 , estimated by the ratio fluence (J/cm^2) by pulse width (μs).

PL treatments were applied to both top and bottom surfaces of the chicken breast fillets placed into Petri dishes (Figures 1(c) and 1 (d)) 15 min after inoculation. Three pulse width values were used 420, 1260, and 2520 μs and up to 6 pulses. Treatment conditions were chosen to allow overlapping fluence levels for different pulse widths for comparing irradiance effect while keeping the total fluence up to $12 \text{ J}/\text{cm}^2$, as suggested by the FDA. A minimum of three independent replicates was performed for each experimental condition.

4.2.5 Temperature measurement

An infrared (IR) thermometer (Fisher Scientific, RS232, Type K) was used to measure the temperature of the chicken breast fillet before and immediately after the PL treatment. These measurements were performed in triplicate on the top of the samples.

4.2.6 Confocal microscopy

Surface topography images were acquired with a Zeiss 710 Confocal microscope (Feldbach, Switzerland) to visualize *Salmonella* inoculated onto the top and bottom chicken breast surfaces, and on solid agar media (smooth surface), before and after PL treatment. To visualize *Salmonella* and evaluate their viability within the aforementioned topographical environments, the chicken and agar samples together with the *Salmonella* inoculum were stained with the live/dead fluorescent dye (*Backlight*) after proper dilution (6 μL dye into 3 mL of 0.15 M NaCl). Specifically, for each sample, 100 μL of the diluted dye solution was added to the surface of interest and incubated in the dark for at least 20 min. For confocal imaging, first, 5 mL of NaCl solution (0.15 M) was aliquoted into a confocal compatible petri dish, where a chicken breast or agar sample was then gently placed, with the spot of interest facing downward and centered within the viewing window. After 1 min of equilibration, the image capture started. Controls images of the non-inoculated chicken breast fillets (top

surface and bottom surface) and agar media were also acquired to (i) obtain the topography of these samples and (ii) help discern *Salmonella* cells from the eukaryotic cells native to the chicken breasts, which were also subjected to the fluorescent staining.

4.2.7 Instrumental color measurement

CIELab scale color parameters were estimated from images taken with a camera (D5500, Nikon Corporation, Japan) and processed with help of the software ImageJ v. 1.6.0 (National Institutes of Health, USA), as proposed by Simão et al. (2021) with minor adaptations. The L* (lightness), a* (redness) and b* (yellowness) values were determined from the mean of three repetition measurements and the values averaged.

4.2.8 Sensory evaluation

Samples treated by pulsed light (1, 3, and 6 pulses of 420 μ s) were compared to untreated (control) by the difference-from-control (DFC) test with 20 trained panelists. According to Rogers (2010) and Whelan (2017), 20 trained panelists is adequate to compare control versus treated samples at the DFC test. Treated and untreated samples were frozen and kept at -18 °C for further sensory DFC evaluation at frozen, raw thawed, and cooked conditions following ISO8589 (2010) standards of individual booths, lighting, and temperature. Frozen samples were assessed immediately after removing from storage. Thawed samples were obtained after 12 to 24 h at 4 °C. Cooked samples were obtained from thawed samples wrapped in aluminum foil and baked in a preheated oven at 220 °C for 10 minutes, assuring the cold spot at 75 °C or more.

The 8-point scale used to assess DFC was presented to the panelists, in which 0 = no difference than control, 2 = low difference than control, 4 = moderate difference from control, 6 = different from control, 8 = extremely different than control. Then, each panelist received the standard sample (control), setting it as a reference to the global appearance attribute. Panelists were instructed to observe and compare color, freshness appearance, and odor of frozen and thawed samples, and color, appearance, odor, taste, and texture of cooked samples.

Each panelist received three samples for each test session, two pieces to be evaluated (PL-treated with 1, 3, or 6 pulses or untreated in randomized order) coded with three-digit and a control sample labeled as "control". All the tests were conducted in duplicate. Controls were used to check the homogeneity of the sample preparation and to monitor the panel's performance. The results were analyzed considering descriptive statistics of the attribute.

4.2.9 Statistical analysis

Treatments and analyses were performed at least in triplicate. Comparison of averages was applied using one-way analysis of variance (ANOVA), and Tukey's test HSD was performed for each PL treatment condition and sample surface side. It was used the Minitab 20 software (Inc. Statistical Software Data Analysis Software, USA) at 95% ($p < 0.05$) significance level. For sensory analysis, ANOVA and Dunnet test were performed for each DFC test, for comparison between control and evaluated samples with the software XLSTAT 2021 (Addinsoft, France) at 95% ($p < 0.05$) significance level.

4.3. RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 Energy delivered and temperature increase

The fluence measured for each PL treatment chosen is in Table 4.1. As expected, fluence increased as the pulse width increased; however, it does not present a directly proportional relationship. Three times longer pulse width (from 420 to 1260 μs) duplicated the fluence, while doubling the pulse width from 1260 to 2520 μs increased around 0.9 J/cm^2 (increase of 21% for 1 pulse and 8% for 2 pulses). The irradiance was estimated as 5.05, 3.25, and 1.96 kW/cm^2 for pulses of 420, 1260, and 2520 μs , respectively.

The sample surface temperature taken before the PL treatment was 1.57 ± 0.79 $^{\circ}\text{C}$ (average \pm standard deviation). After the treatment, the temperature variation ΔT was always positive and no bigger than 5 $^{\circ}\text{C}$ (Table 4.1). Overall, increasing pulse number or pulse width led to higher total fluence, which increased the extent of temperature rise due to radiative energy.

4.3.2 Salmonella reduction on samples' top surface

Table 4.1 presents the log-reduction, $\log(N/N_0)$, of *Salmonella* count on samples top surface, comparing statically the effect of the different number of pulses (1-6) of 420, 1260, and 2520 μs while keeping fluence level up to around 12 J/cm^2 at 3000 V and 4.6 cm from the lamp.

In this work, the *Salmonella* log reduction was in the range 1-2 log (except 5 pulses/420 μ s that reached - 2.33), as presented in Table 1. In a previous study, Mengarda-Buosi et al. (2021), with the same PL system and similar fluence and irradiance values, observed up to 6-7 log reduction for the same bacteria on an agar surface. PL treatments are, in general, far more effective when applied to solid agar medium (smooth surface) than in actual food products (Moraru, 2011). The values of *Salmonella* reduction for the chicken samples found in the present study (Table 4.1) are in the same range, about 2 log or less for fluence up to 12 J/cm², observed by other authors in PL treatment of meat products (HAUGHTON et al., 2011; HEINRICH et al., 2016;). Although higher decontamination levels could be achieved by increasing the fluence, legislation and product quality losses, such as lipid oxidation and sensory modification, may impose restrictions (LUKSIENE et al., 2009; MCLEOD et al., 2018; WAMBURA & VERGHESE, 2011).

A longer pulse width did not significantly increase the *Salmonella* reduction for 1, 2, or 3 pulses, even with fluence values more than twice bigger. The longer the pulse, the smaller the irradiance, which could explain why bigger fluences did not present higher lethality. On the other hand, using the same irradiance, when the cumulative fluence increased at a pulse width, a higher log reduction was found, as observed when comparing 1 pulse vs. 5 and 6 pulses in Table 4.1 for 420 μ s. One can assume that increasing the pulse number creates more opportunities for PL to breach into the shaded area and inactivate the bacteria there. Additional 1 log reduction from increasing the number of pulses up to 5 or 6 for reaching around 2 log as total decontamination is a relevant result for food safety purposes. For example, quantitative microbial risk assessment models indicate that around 2 log-reduction in *Salmonella* concentration on broiler carcasses should substantially reduce the risk of human exposure to salmonellosis (NAUTA et al., 2005).

Table 4.1. Fluence delivered, temperature variation (average \pm standard deviation), and *Salmonella* log-reduction (average \pm standard deviation) on the top side of chicken breast for PL treatment at 3000 V and 4.6 cm distance from the light source for different number of pulses and pulse width.

Number of pulses	Pulse width								
	420 μ s			1260 μ s			2520 μ s		
Fluence (J/cm ²)	Δ T (°C)	log (N/N_0)	Fluence (J/cm ²)	Δ T (°C)	log (N/N_0)	Fluence (J/cm ²)	Δ T (°C)	log (N/N_0)	
1 pulse	2.12	2.63 \pm 0.35 ^{Aa}	-1.22 \pm 0.67 ^{Aa}	4.09	1.40 \pm 0.30 ^{Ab}	-1.18 \pm 0.67 ^{Aa}	4.95	1.70 \pm 0.10 ^{Aab}	-1.62 \pm 1.04 ^{Aa}
2 pulses	4.24	1.73 \pm 0.38 ^{Aa}	-1.54 \pm 0.58 ^{ABa}	9.18	3.60 \pm 0.27 ^{Bb}	-1.87 \pm 0.64 ^{Aa}	9.90	3.07 \pm 0.21 ^{Bb}	-1.34 \pm 0.68 ^{Aa}
3 pulses	6.36	2.60 \pm 0.10 ^{Aa}	-1.55 \pm 0.76 ^{ABa}	12.27	3.77 \pm 0.67 ^{Ba}	-1.58 \pm 0.82 ^{Aa}	-	-	-
4 pulses	8.48	4.10 \pm 0.10 ^B	-1.77 \pm 0.82 ^{AB}	-	-	-	-	-	-
5 pulses	10.60	3.80 \pm 0.44 ^B	-2.33 \pm 0.80 ^B	-	-	-	-	-	-
6 pulses	12.72	4.83 \pm 0.21 ^B	-1.93 \pm 0.94 ^B	-	-	-	-	-	-

^{AB} Different upper-case letters in a column means statistical difference at 95% of significance ($p < 0.05$).

^{ab} Different lower-case letters in a row means statistical difference at 95% of significance ($p < 0.05$).

4.3.3 *Salmonella* reduction on samples' bottom surface

PL-treatment of the so-called bottom surface of the chicken breast fillets was performed using the parameters 1-6 pulses for 420, 1260, and 2520 μs , leading to fluence up to around 12 J/cm^2 (3000 V and 4.6 cm from the lamp), as shown in Table 4.2. Log-reduction found for those treatments were into the range 0.58 to 1.17 log. Besides, no significant difference was observed when changing either number of pulses or pulse width.

Table 4.2. *Salmonella* log-reduction, $\log(N/N_0)$, on the bottom side of the chicken breast after PL-treatment depending on pulse width and number of pulses.

Number of pulses	Fluence (J/cm^2)	Pulse width				
		420 μs	1260 μs	2520 μs		
		$\log(N/N_0)$	$\log(N/N_0)$	$\log(N/N_0)$		
1 pulse	2.12	$-0.58 \pm 0.24^{\text{Aa}}$	4.09	$-0.82 \pm 0.33^{\text{Aa}}$	4.95	$-0.93 \pm 0.42^{\text{Aa}}$
2 pulses	4.24	$-0.83 \pm 0.14^{\text{Aa}}$	9.18	$-0.71 \pm 0.28^{\text{Aa}}$	9.90	$-1.17 \pm 0.08^{\text{Aa}}$
3 pulses	6.36	$-0.85 \pm 0.49^{\text{Aa}}$	12.27	$-0.89 \pm 0.18^{\text{Aa}}$		
4 pulses	8.48	$-1.01 \pm 0.19^{\text{A}}$				
5 pulses	10.60	$-0.59 \pm 0.18^{\text{A}}$				
6 pulses	12.72	$-0.94 \pm 0.37^{\text{A}}$				

^{AB} Different upper-case letters in a column means statistical difference at 95% of significance ($p < 0.05$).

^{ab} Different lower-case letters in a row means statistical difference at 95% of significance ($p < 0.05$).

PL-treatment effectiveness on *Salmonella* decontamination was around one order of magnitude bigger (around 1 log) when applied at the top surface than at the bottom surface. Statistical analysis confirmed a significant difference at 95% of confidence ($p < 0.05$) when comparing each treatment setup (number of pulses and pulse width) in terms of *Salmonella* log-reduction between both sides.

It is notorious in Figure 4.1 a rougher surface at the bottom side (Figure 4.1b) in comparison to the top side (Figure 4.1a). The complex topography of the bottom surface increased the chance of *Salmonella* survival after PL. The presence of many peaks and valleys at the bottom surface can shield bacteria against light incidence. Other hypotheses are that, due to a higher specific surface area, bacterial cells have more possibilities to bound and be covered by food matrix components, and some bacteria overlapping when soaked in a kind of microwell formed by cracks on this surface.

For a high PL-treatment efficiency, solid foods must ideally be smooth, and without roughness, pores, grooves and crevices which could shadow the microorganisms from the light (ELMNASSER et al., 2007; GUERRERO-BELTRÁN & BARBOSA-CÁNOVAS, 2004). Figure 4.2 has representative confocal microscopy images of a solid agar media (Figure 4.2a), which is the smoother one; and top (Figure 4.2b) and bottom (Figure 4.2c) chicken breast surfaces, both much rougher than the agar with the presence of peaks and valleys at the bottom surface. Other studies also showed roughness as criteria for impairing PL-treatment, such as in meat products where up to 6 logs more bacteria were found comparing to agar surface after the treatment (HEINRICH et al., 2015); while *Salmonella* and *E. coli* were more likely to survive on strawberry (rougher) than on blueberries (smoother) surface in around 2 - 3 log (CAO et al., 2017).

Figure 4.2. Confocal microscopy images (a) agar media surface, (b) chicken breast top surface and (c) chicken breast bottom surface.

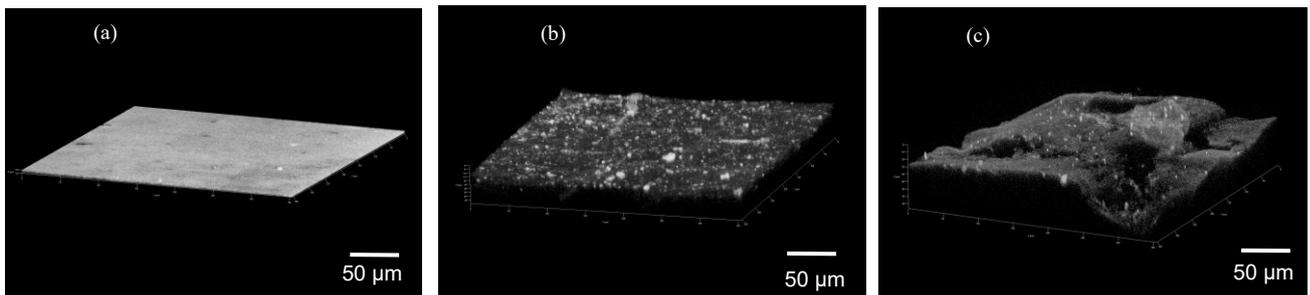
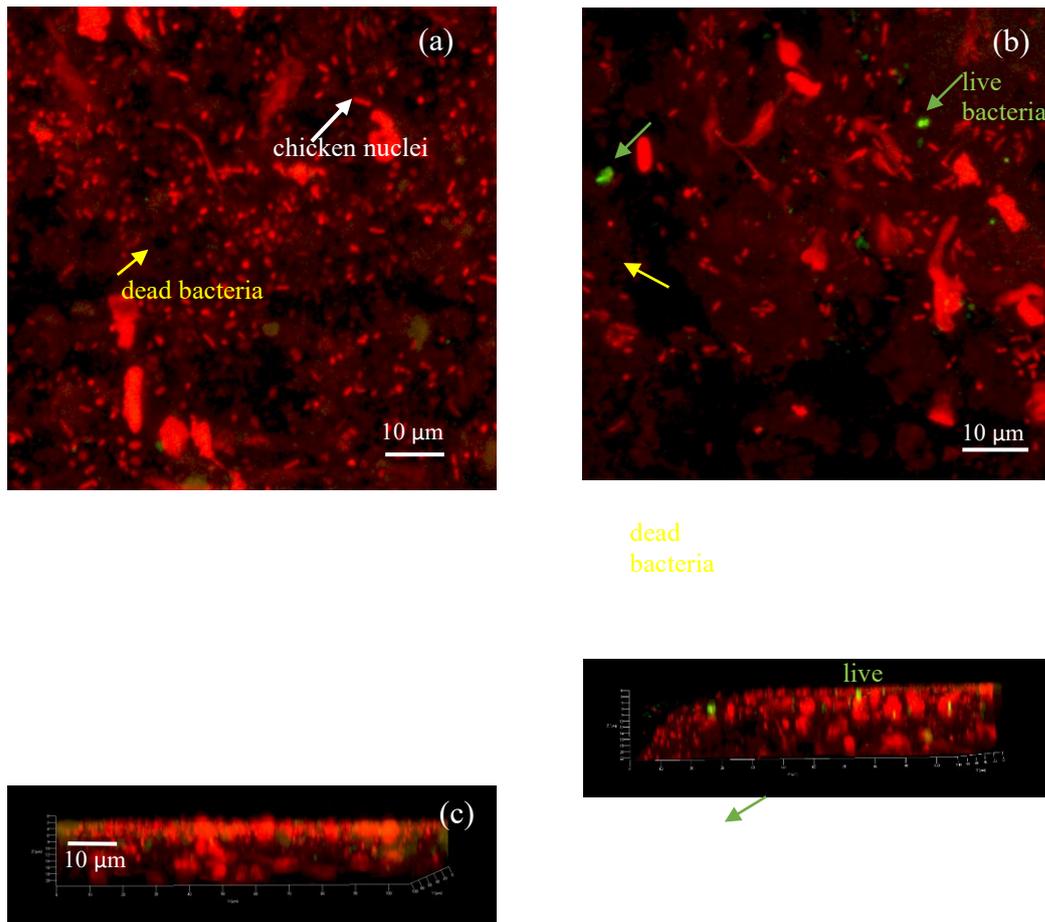


Figure 4.3 presents the confocal images of PL-treated chicken breast top (Figure 4.3a superior view, and Figure 4.3c three-dimensional view) and bottom (Figure 4.3b superior view, and Figure 4.3d three-dimensional view) surfaces inoculated with *Salmonella*. The treatment selected was 6 pulses of 420 μ s at 3000 V with cumulative fluence of 12.26 J/cm². Green-colored cells representing live bacteria were often observed on the bottom surface, while red-colored cells (dead) were the vast majority of bacteria identified on the top surface. Furthermore, the reconstructed three-dimensional z-stacks taken on a representative chicken breast bottom surface indicated that the survival cells tend to occur in the interstitial spaces between chicken cells (Figure 4.3d). These images provide direct evidence that multiscale, hierarchical topographies, ranging from the macroscopic unevenness resulted from tissues to the microstructures resulted from distributions of chicken cells, could provide shading for bacterial cells, and limit the impact of PL treatment.

Figure 4.3. Confocal microscopy images of PL-treated (6 pulses of 420 μ s at 3000 V and total of 12.26 J/cm²) chicken breast: (a) superior view of the top surface, (b) superior view of the bottom surface, (c) three-dimensional view of the top surface, and (d) three-dimensional of the bottom surface. Chicken nuclei protein was marked as red (bigger than 10 μ m), and Salmonella cells alive in green and dead in red (smaller than 10 μ m).



4.3.4 Instrumental Color

The instrumental measurement of color parameters L^* (lightness), a^* (redness), and b^* (yellowness) of chicken breast top surface PL-treated with 1, 3, and 6 pulses of 420 μ s, at 3000 V and 4.6 cm distance from the light source. and untreated are presented in the Table 4.3.

Overall, no significant differences ($p < 0.05$) on lightness (L^*) and yellowness (b^*) were found between treated and untreated samples. However, the redness value a^* was significantly reduced after PL treatment with 1, 3, or 6 pulses, although the sensory panel

observed no change in the redness (see next section). The same results were found for PL on beef meat, where instrumental color values were not affected by 1 pulse treatment. However, PL treatment of 5 pulses significantly decreased the redness (a^*) parameter, while no significant differences were observed for lightness (L^*) and yellowness (b^*), and the change in redness were not observed by a sensory panel (TOMASEVIC et al., 2019). Keklik et al. (2009) indicated that mild and moderate PL-treatments did not affect the color of chicken samples, although extreme PL treatment increased L^* , a^* , and b^* values significantly.

Table 4.3. Instrumental measurement of color parameters L^* (lightness), a^* (redness), and b^* (yellowness) on top chicken breast for PL-treated and untreated samples.

PL Treatment	Fluence (J/cm ²)	Color Parameter		
		L^*	a^*	b^*
untreated	-	75.03 ± 2.67 ^A	10.71 ± 2.10 ^A	5.49 ± 2.17 ^A
1 pulse	2.12	77.49 ± 0.91 ^A	6.85 ± 0.60 ^B	1.67 ± 3.49 ^A
3 pulses	6.36	77.16 ± 1.77 ^A	8.06 ± 1.61 ^B	6.09 ± 4.99 ^A
6 pulses	12.72	76.76 ± 1.83 ^A	7.14 ± 1.08 ^B	3.95 ± 2.86 ^A

^{AB} Different upper-case letters in a column means statistical difference at 95% of significance ($p < 0.05$).

4.3.5 Sensory evaluation

Table 4.4 summarize the score obtained by the sensory DFC test for frozen, thawed, and cooked samples. Overall, there is no difference between PL-treated versus control samples, exception for cooked samples PL-treated with 6 pulses. Similar studies on fresh chicken meat did not identify sensory differences (PASKEVICIUTE et al. (2011), up to 5.4 J/cm²) or registered statistically significant difference due to a sunburnt odor that was not identified after cooking (MCLEOD et al. (2017), only at 10.8 J/cm², the higher fluence evaluate). All difference values observed were relatively low (below 3.30), indicating that treated samples are close to control.

Table 4.4. Sensory DFC test score (average \pm standard deviation) about global appearance for assessing control vs. PL-treated/untreated frozen, thawed, and cooked samples. Panelists' score was 0 = no difference than control, 2 = low difference than control, 4 = moderate difference from control, 6 = different from control, 8 = extremely different than control. PL-treated samples received 1, 3, and 6 pulses (420 μ s at 3000 V and 4.6 cm from the light source). Statical analysis used ANOVA and Dunnett test. MSD is the minimum significant difference.

Condition	Control Score	PL Treated Samples						p-value	MSD
		1 pulse		3 pulses		6 pulses			
	Score	Score	DFC	Score	DFC	Score	DFC		
Frozen	2.25 \pm 1.16 ^A	1.70 \pm 1.38 ^A	-0.55	1.10 \pm 1.98 ^A	-0.85	1.80 \pm 1.96 ^A	-0.45	0.447	1.10
Thawed	1.95 \pm 1.66 ^A	2.10 \pm 1.77 ^A	0.15	2.45 \pm 2.11 ^A	0.50	2.10 \pm 2.02 ^A	0.15	0.850	1.24
Cooked	1.10 \pm 1.41 ^A	1.85 \pm 1.87 ^A	0.75	2.08 \pm 1.99 ^A	0.95	3.30 \pm 2.03 ^B	2.20	0.004	1.24

^{AB} Different upper-case letters in a row means statical difference at 95% of significance ($p < 0.05$).

4.4. CONCLUSIONS

PL technique is an apt method of decontamination for chicken breast pieces. Overall, the treatments did not significantly modify the quality attributes, and slight differences were found when increasing the fluence, but they are not a concern due to being relatively low. On the other hand, surface irregularities are challenging since a significant difference between the log-reduction of inoculated *Salmonella enterica* at the top (smoother) surface and the bottom (rougher) surface. It was demonstrated that the rougher surface impaired the treatment in up to 1-log reduction, independently of the PL treatment parameters here tested. This study demonstrated that is important to properly assess each surface, indicating that the differences must be considered when designing PL application for the food industry. The present study suggests that the effectiveness of PL as part of a risk reduction strategy in industrial food processing can be improved by shorter and more frequent pulses, leading to a higher irradiance and increasing the chance of *Salmonella* (and other eventual microorganisms) inactivation.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and CAPES-PRINT Process 88881.310374/2018-01. The authors are thankful to Xenon Corp. (Wilmington MA, USA) for providing the Pulsed Light unit used in the experiments, the Food Safety Lab (Cornell University) for providing the *Salmonella* strains, and the BRF S.A. company for financial support.

CAPÍTULO 5 - Luz Pulsada na Inativação de *Salmonella* em Peito de Frango Congelado

Neste capítulo foi avaliada a aplicação da luz pulsada para inativação de *Salmonella* na superfície de filé de peito de frango após congelamento e embalagem. Métodos de inativação de micro-organismos pós-processamento são extremamente relevantes, a fim de evitar contaminação após o processo. Na literatura foram encontrados estudos na inativação de micro-organismos em peito de frango e outros alimentos resfriados, frescos, e alimentos sob temperatura ambiente, por luz pulsada como mostrado nos capítulos 3 e 4. No entanto, a aplicação de luz pulsada em superfícies de alimentos congelados não foi encontrada. Assim, neste capítulo, os resultados de inativação de *Salmonella* inoculada na superfície superior do filé de peito de frango, embalado, congelado e tratado por luz pulsada foram comparados aos resultados obtidos no capítulo 4 para frango resfriado.

A importância do estudo leva em consideração as legislações e órgãos públicos do Brasil, que mostram que a contaminação de alimentos é um grande problema de saúde pública, e que as soluções devem ser averiguadas da melhor forma possível. Hoje, os diagnósticos de presença ou ausência do patógeno *Salmonella* é disponibilizado apenas após alguns dias do produto estar congelado e embalado e disponível na estocagem para envio ao consumidor.

Este capítulo será submetido como um *short communication*.

5. Pulsed Light treatment on frozen chicken breast: *Salmonella enterica* reduction

ABSTRACT

The control of pathogenic bacteria, such as *Salmonella* is quite complex, since these microorganisms are able to survive in different storage situations, such as freezing. Chicken meat can be contaminated due various stages of chicken processing, from the slaughter to the handling of carcasses and cuts. Beside this it can be a vehicle for the transmission pathogenic bacteria, specially *Salmonella*. In this study, we investigated the efficacy of PL treatment on *Salmonella enterica* inactivation on frozen chicken breast. The influence of PL parameters, such as pulse width of 420 μ s, different number of pulses and fluence of 2.12 to 12.72 J/cm², were applied to the *Salmonella*-inoculated chicken breast top surface frozen, then evaluated the microbiological log reduction. Pulse width and number of pulses resulted in similar decontamination of *Salmonella*. The *Salmonella* log-reduction ranged from 0.79 to 1.87 for

frozen chicken breast top surface. The results indicated that PL could be used in chicken industry, especially as a part of a *Salmonella* control strategy for frozen finished product.

5.1 INTRODUCTION

Raw chicken meat might be a vehicle for the transmission of numerous microorganisms, some of them pathogenic to humans. *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Campylobacter* are the most prevalent foodborne pathogens associated with raw chicken (HAUGHTON et al., 2011; MCLEOD et al., 2018, STEFFENS et al., 2017). Chicken meat contamination causes risks to the health of consumers and economic losses to producers. In 2016, the Food Safety Inspection Service (FSIS) within the US Department of Agriculture (USDA) implemented performance standards for *Salmonella* spp., and *Campylobacter* on poultry. This new protocol set the maximum acceptable percent positive for chicken parts at 15.4 for *Salmonella* spp. The intention of this protocol is the reduction of the occurrence foodborne illness outbreaks associated with raw poultry (USDA, 2012; Federal Register, 2016). Industry efforts to comply with new performance standards include a variety of antimicrobial interventions applied during chicken processing.

The control of cross contamination with pathogenic bacteria is being a challenge, since these microorganisms are able to survive in different storage situations, such as freezing. Frozen meat has good economic benefits because of its long shelf life and being suitable for long-distance transportation and export operation. Freezing is an efficient preservation method to maintain quality over the long term. It stops the microorganism growth to some extent, but complete elimination of microorganisms is not possible especially for spore forming bacteria. Low temperatures reduce the *Salmonella* metabolism, but it can migrate even in freezing temperatures (TOZZO et al., 2018), and after thawing it can multiply in the food.

Pulsed light is a non-thermal technology, that operates with short intense pulses in a wide range of spectrum of light. That can inactivate several microorganisms, and the inactivation kinetics has been adequately demonstrated by several authors (ROWAN, 2019). Depending on the type of microorganism, up to 6 log reduction are reported on the surfaces of meat products, but in general the reduction in counts is limited to 3 log units (HEINRICH et al., 2016; VAN IMPE et al., 2018). The effectiveness of pulsed light is related to the type of microorganisms, and their concentration in the substrate, and also to the pulsed light

parameters, and properties of the substrate, such as optical properties and its topography. The treatment is most effective on smooth, non-reflecting surfaces or in clear liquids, and it is also suitable to food packaged in UV-transparent materials (DE MORAES and MORARU, 2018). Studies investigating the inactivation of *Salmonella* by pulsed light on the surface of fresh chicken meat are found in the literature (HAUGHTON et al., 2011; KEKLIK et al., 2010, LUKSIENE et al., 2011, MCLEOD et al., 2018). However, there is no data in the literature about PL treatment on frozen packaged foods. PL in-package application is interesting as it allows treatment of the food inside the packaging and thus avoid undesirable post-treatment recontamination. However, to ensure an effective treatment it is necessary not only to consider the food matrix, microorganism and process parameters but also the intended packaging material in terms of transmissibility and process stability. Chicken fillets can be treated in packages covered with UV permeable top film which was evaluated for its ability to transmit UV light, thus avoiding recontamination of the meat. Treatment after packaging should be simple to implement at industrial packaging lines without reductions in production efficiency. There are only few studies available in the scientific literature which deals with in-package decontamination of foods with PL (HEINRICH et al., 2016).

The current research is undertaken to investigate the microbial reduction effects of PL for inactivation of *Salmonella enterica* inoculated in frozen chicken breast fillet top surface.

5.2.MATERIALS AND METHODS

5.2.1 Salmonella enterica inoculum and inoculation

The inoculum of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* containing four serotypes (Heidelberg, Typhimurium, Minnesota, and Enteritidis) were prepared according to Mengarda-Buosi et al. (2021) as presented before on section 3.2.2.

5.2.2 Chicken breast fillet samples

Fresh boneless skinless chicken breast fillets were obtained from a local supermarket (Ithaca, NY, USA) at least 5 days before ending their labeled shelf-life and stored in the refrigerator at 4 °C until use. All cutting, handling and inoculation process steps were carried out as described before in the section 3.2.2 that were prepared according to Mengarda-Buosi et al. (2021), with the fresh samples. Chicken breast fillets were cut into a round shape

(projected surface area of 28.26 cm²) using a petri dish (diameter 6 cm), as presented in Figure 4.1c for the top side surface and in Figure 4.1d for the bottom side surface. The petri dish was used for holding the samples during PL experiments.

For each experiment, the following samples of chicken breast fillet, top surface, were prepared: (1) Negative control, reading and quantification of the contaminating natural microbiota (fresh and frozen) for *Salmonella* presence investigation and enumeration; (2) Positive control, reading and quantification of the inoculated bacterial sample (frozen sample); and, (3) Samples after PL treatment (coded by type of treatment) (frozen sample).

After inoculation, the samples were kept for 15 min in the laminar flow cabinet and at room temperature, to allow for the fixation and internalization of the bacteria. Then, after this 15-minutes period, the samples were then packaged in a transparent sterile polyethylene (PE) bag (Nasco, Whirl-pak) and subjected to freezing at -12 °C for a minimum of 48 hours and a maximum of 96 hours. The positive control samples were also subjected to freezing for later reading following the same methodology as the samples treated by PL.

This packaged and frozen condition mimics the process and the product in the current industrial condition, thinking of simulating the indication of the application of post-processing technology. Frozen samples were removed from the freezer and immediately subjected to the pulsed light treatment and then for microbiological analysis. The packaging material, sterile polyethylene (PE) (Nasco, Whirl-pak), chosen, in addition to being sterile, was validated for its transparency condition and 95% UV-C light transmission values between 240 nm and 280 nm were informed by the manufacturer. Approximately 90% of the fluence is transmitted through this by the polyethylene packaging (PE 90 µm). Keklik, Demirci and Puri (2010) showed that PE, PP and LDPE packaging are capable of transmitting UV radiation in 75%, 72% and 68% at 260 nm, respectively. In Figure 5.1, the image of the packaging of a transparent plastic polyethylene bag (Nasco, Whirl-pak) with a sample of chicken breast fillet is presented.

Figure 5.1. Chicken breast fillet sample in transparent plastic PE bag



Source: Author, 2019

PL experimental unit X-1100 (XENON Corp. Wilmington MA, USA) was the equipment used in the PL experiments. PL parameters for the experiments were 420 μ s pulse width and varying number of pulses and fluence, to evaluate and compare the bacterial inactivation effect versus fluences (J/cm^2), at 3000 V, at a distance of 4.6 cm. This distance was chosen as a function of the *Salmonella* inactivation values obtained in previous experiments, with the fresh samples, presented in Chapter 04.

The experiments were carried out with at least 5 repetitions for each chosen treatment. ANOVA and Tukey test (95% of confidence) (Minitab software) were carried out to assess data reproducibility and show differences between treatments.

5.2.3 Microbiological Analysis

Microbial analyses were carried out as described in section 3.2.3. Immediately after PL treatment, the frozen samples were added of 30 mL of buffer solution (butterfield phosphate solution + magnesium chloride, Weber Scientific) into the packaging of each chicken breast fillet sample to rinse the chicken surface. No thawing was necessary, the samples were mixed and homogenized in a stomacher for 1 min, 230 rpm (Stomacher model 400, Seward Ltd., Worthing, UK). Then, 0.1 mL aliquots of the solutions were serially diluted in 0.9 mL of buffer solution (butterfield phosphate dilution solution + magnesium chloride, Weber Scientific) in 1.5 mL Eppendorf tubes. After 100 μ L of each dilution was spread on XLD agar culture medium (Xylose Lysine Deoxycholate, Difco). Plates were incubated, upside down, at 37 °C for 24 h. Afterwards the typical colonies of *Salmonella* were enumerated. Counts were

expressed as colony forming units per ml and then converted to cm² of chicken breast fillet surface (CFU/cm²). This procedure was the same for positive and negative control sample.

To calculate the data and present the results related to the inactivation of *Salmonella* bacteria in the chicken breast fillet experiments, the following mathematical equation was used to calculate the logarithmic reduction (Log 10):

$$\text{Log Bacterial reduction} = \text{Log}\left(\frac{N}{N_0}\right) \quad (01)$$

Where, N_0 (CFU/cm²) is the positive control before PL treatment, representing the initial situation of the sample with inoculum, and N (CFU/cm²) after PL treatment.

5.3. RESULTS AND DISCUSSION

The results of *Salmonella* reduction (CFU/cm²) on frozen chicken breast fillet top surface under different PL treatment conditions are shown in Table 5.1.

Table 5.1. *Salmonella* log reduction on frozen chicken breast fillet top surface

Pulse width	420 μs	
number of pulses	Fluence (J/cm ²)	Log N/N ₀
1 pulse	2.12	-0,79± 0.55 ^A
2 pulses	4.24	-1,41 ± 0.26 ^A
3 pulses	6.36	-1.65 ± 0.63 ^A
4 pulses	8.48	-1.87 ± 0.31 ^A
5 pulses	10.60	-1.17± 0.13 ^A
6 pulses	12.72	-1.55 ± 0.61 ^A

The upper-case letters are comparing the data in the same column varying the number of pulses and fluence. Data containing the same letter were not different ($p > 0.05$)

The experiments with top surface of frozen chicken breast achieved results ranging from 1.87 log reduction and 0.79 log reduction, with 4 pulses and 1 pulse of 420 μs, respectively. The results were considered non-significantly different ($p > 0.05$), so in the PL conditions studied, the inactivation of *Salmonella enterica* on top surface of the frozen chicken breast fillet was not dependent on the fluence at 420 μs. It is observed in Table 5.1 that *Salmonella* log-reduction rate reached greater than 1-log reduction in most treatments. These data are comparable with fresh chicken breast, top surface, results from Keklik et al (2009) and McLeod (2017) as well as with the results presented in Chapter 4. Results from

Chapter 4 processed in the same conditions of pulsed light were compiled and shown together with the results of this chapter, Table 5.2.

Table 5.2. *Salmonella* log reduction on frozen chicken breast fillet top surface versus fresh chicken breast fillet top surface

Pulse width		420 μ s	
number of pulses	Fluence (J/cm ²)	Fresh Log N/N ₀	Frozen Log N/N ₀
1 pulse	2.12	-1.22 \pm 0.67 ^{Aa}	-0.79 \pm 0.55 ^{Aa}
2 pulses	4.24	-1.54 \pm 0.58 ^{AB b}	-1.41 \pm 0.26 ^{Ab}
3 pulses	6.36	-1.55 \pm 0.76 ^{AB c}	-1.65 \pm 0.63 ^{Ac}
4 pulses	8.48	-1.77 \pm 0.82 ^{AB d}	-1.87 \pm 0.31 ^{Ad}
5 pulses	10.60	-2.33 \pm 0.80 ^{Be}	-1.17 \pm 0.13 ^{Af}
6 pulses	12.72	-1.93 \pm 0.94 ^{Bg}	-1.55 \pm 0.61 ^{Ag}

^A The upper-case letters compare the data in the same column varying the number of pulses and fluence.

^a The lower-case letters compare the data in the same row at the same number of pulses but different pulse width.

Considering row and column, data containing the same letter were not considered different ($p > 0.05$).

PL was effective under packed and freezing conditions to inactivate *Salmonella* in chicken fillets, being comparable to unpacked fresh chicken breast results. Overall, the freezing condition did not influence the inactivation of *Salmonella* on the top surface of the chicken breast by PL, in the same PL fluence level. A study reported by Tozzo et al. (2018) stated that the *Salmonella* migration time does not depend on the temperature of 2, 7 and - 30 °C in the chicken breast. This could explain our similar results when comparing fresh and frozen chicken breast, since the experiments were performed under the same conditions of PL. Thus, the reflection of frozen water did not influence the inactivation of *Salmonella* on top surface of the chicken breast. Chicken breast can be treated after freezing and packed with clear plastic film (PE) by PL and offer the same level of *Salmonella* inactivation.

Further Processed Food inside the package by non-thermal technologies, such as PL, may require changes in the design or type of packaging material used to achieve the intended efficiency (HEINRICH et al., 2015), for example, those that undergo light treatments require transparent packaging materials that are transmissible to radiation within the spectra used.

Treatment after packaging and in frozen condition should be simple to implement on industrial packaging lines without reducing production efficiency. However, exposure of both surfaces of the food must be considered for proper implementation. It is noteworthy that materials that can interfere with light transmission, such as labels, ink-printed labels, metallization, lamination with aluminum foil, among others, should be avoided, since it can lead to uneven decontamination of the packaged product (HEINRICH et al., 2015).

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES

A tecnologia de luz pulsada é efetiva na inativação de *Salmonella* subsp. *entérica* (*Typhimurium*, *Enteritidis*, *Heidelberg* e *Minnesota*), individualmente e em conjunto, inoculadas em meio de cultura e nas superfícies de filé de peito de frango nas condições de carne resfriada e congelada. No entanto, o valor de inativação de *Salmonella* subsp. *entérica* é dependente das propriedades da superfície e de como a bactéria interage com ela. A topografia da superfície é fundamental na efetividade do tratamento da carne de peito de frango com a Luz Pulsada, além desta efetividade também depender dos parâmetros tensão elétrica aplica à lâmpada e da irradiância.

A inativação dos diferentes sorovares de *Salmonella* em meio de cultura foi similar nas mesmas condições de operação da luz pulsada. A tecnologia de luz pulsada foi eficaz para a inativação de quatro sorotipos de *Salmonella enterica* (*Typhimurium*, *Enteritidis*, *Heidelberg* e *Minnesota*) e um coquetel deles. A inativação aumentou de redução de 3 para 6 log quando a tensão aumentou de 2.000 para 3.000 V, mantendo um nível de fluência semelhante em torno de 191-198 mJ / cm² para *S. Typhimurium*. No geral, a inativação de *Salmonella* atingiu uma redução de até 6 a 7 log para todos os quatro sorotipos e mistura de coquetel após apenas um único pulso de luz com uma fluência de 280 mJ / cm². Um achado muito importante deste estudo é que os tratamentos de luz pulsada conduzidos sob fluência semelhante, mas em diferentes voltagens e irradiâncias, resultaram em diferentes níveis de inativação microbiana. Além disso, os resultados demonstraram valores de redução de log não significativamente diferentes para cada sorotipo e o coquetel. Em um nível de fluência intermediário, *S. Enteritidis* apresentou uma redução de 1 log maior do que outros sorotipos. No entanto, o uso de um coquetel de sorotipos de *Salmonella enterica* para delinear o tratamento de luz pulsada é adequado, uma vez que a mistura acompanhou os sorotipos mais resistentes. Essas descobertas sugerem que é viável e eficaz ajustar a tensão de descarga da luz pulsada e a largura de pulso, de modo que uma inativação mais eficaz de bactérias possa ser alcançada, mantendo a qualidade do produto e economizando energia, abrindo assim novas possibilidades para otimizar o tratamento de PL para uma dada aplicação industrial.

A tecnologia da luz pulsada é um método adequado de descontaminação de peito de frango. No geral, os tratamentos não modificaram significativamente os atributos de qualidade e foram encontradas pequenas diferenças ao aumentar a fluência, mas não são uma preocupação por serem relativamente baixos.

A topografia e rugosidade do material a ser tratado por luz pulsada mostra-se como um ponto crucial na eficiência da inativação de *Salmonella* por luz pulsada. A inativação de *Salmonella* subsp. *entérica* em meio de cultura (superfície lisa), na superfície do frango superior (abaixo da pele) e na superfície inferior (lado do corte, superfície altamente irregular) apresentam resultados máximos de aproximadamente 7 logs, 2 logs e 1 log, respectivamente. Na superfície superior de filé de peito de frango embalado e congelado, a inativação pela luz pulsada de *Salmonella* não apresenta diferenças significativas quando comparados aos resultados do peito de frango resfriado. O que nos permite inferir que a aplicação da luz pulsada em alimentos após embalagem e congelamento pode ser uma alternativa viável para o tratamento da carne.

O tratamento por luz pulsada nas condições testadas em peito de frango resfriado não afeta a temperatura superficial (aumento da temperatura inferiores a 5°C) e nem a qualidade e os aspectos da carne avaliados pela cor instrumental e pela análise sensorial por panelistas treinados quando o peito de frango tratado for avaliado congelado, resfriado ou cozido. Estes resultados indicam que a luz pulsada pode ser aplicada dentro do limite estabelecido por agências regulatórias (12 J/cm²) para a inativação de diferentes sorovares de *Salmonella enterica* sem impactos sensíveis nos aspectos do produto.

O presente estudo sugere que a eficácia da luz pulsada como parte de uma estratégia de redução de risco no processamento industrial de alimentos pode ser melhorada por pulsos mais curtos e frequentes, levando a uma maior irradiância e aumentando a chance de inativação de *Salmonella* (e outros microrganismos relevantes).

6.1 TRABALHOS FUTUROS

- Estudo do tempo de internalização da bactéria na carne de frango com tratamento por luz pulsada. Este estudo pode definir o tempo de contato que a *Salmonella* pode ficar com a carne de frango para que a luz pulsada tenha a maior eficiência e definir o local de implantação da luz pulsada na indústria.
- Explorar menor quantidade de contaminação (valores inferiores da 3 log, para inoculação).
- Estudo do estado da água e da camada de água superficial no produto antes do tratamento por luz pulsada. As propriedades ópticas do líquido superficial podem influenciar a inativação por luz pulsada.
- Explorar mais amostras na câmara de luz pulsada, bem como validar a equivalência de posições para a equivalência da fluência dos flashes de luz.
- Estudo da vida útil de frango resfriado (4 °C) após tratamento por luz pulsada, considerando o crescimento da flora natural deteriorante.
- Explorar outros cortes de frango com e sem pele e com e sem osso, e entender as diferenças entres os efeitos da luz pulsada em diferentes composições e superfícies.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. Relatório Anual ABPA 2021. Disponível: http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf. Acesso em 17 julho 2021.

AMSA. AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION - **Research guideliness for cookery sensory and instrumental tenderness measurement of fresh meat**. Chicago, 1995. 48 p.

ARTÍGUEZ, Mari Luz; MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, Iñigo. Process Parameters Affecting *Listeria innocua* Inactivation by Pulsed Light. **Food and Bioprocess Technology**. v. 7, n. 9, p. 2759–2765, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1344-4>

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Salmonella**. Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control: second edition. Elsevier, 2009.p.627–674. <https://doi.org/10.1533/9781845696337.2.627>

BHAVYA, M. L.; UMESH HEBBAR, H. **Pulsed light processing of foods for microbial safety**. Oxford University Press, 2017. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx017>

BINTSIS, T., LITOPOULOU-TZANETAKI, E. and Robinson, R.K. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. **J. Sci. Food Agric.**, 80: 637-645, 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000501\)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO;2-1)

BORGES, K. A., Furian, T. Q., de SOUZA, S. N., TONDO, E. C., STRECK, A. F., SALLE, C. T. P., de SOUZA MORAES, H. L., & do NASCIMENTO, V. P. Spread of a major clone of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in poultry and in salmonellosis outbreaks in Southern Brazil. **Journal of Food Protection**, 80(1), 158–163, 2017. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-299>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visalegis. Resolução RDC n. 12/2001. Aprova o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos. De 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/elegis/>. [Acesso em 5 julho 2021]

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visalegis. Resolução RDC n. 13/2001. Aprova o regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados e congelados. De 2 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/elegis/>. [Acesso em 5 julho 2021]

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº.210, de 10 de novembro de 1998. Brasília: Regulamento Técnico de Inspeção Tecnológica e Higiênico Sanitária de Carnes de Aves, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Anexo II do Ofício Circular. Conjunto DFIP – DSA nº1 / 2008, de 16/09/ 2008. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. DCI/DIPOA. Circular nº 38, de 08 de novembro de 2010. Revisão do Ofício Circular/DIPOA nº010/2005. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 nov. 2010.

BRASIL. Decreto nº. 9.013, de 29 de março de 2017.Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília: Diário Oficial da União, 2017.

BRASIL. Portaria n.74, de 4 de maio de 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília: 2019.

BRASIL. Decreto nº.10468, de 18 de agosto de 2020. Altera o Decreto nº.9.013, de 29 de março de 2017, que regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Brasília: 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução normativa nº 20 de 21 de outubro de 2016. Institui o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. Nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal. Diário Oficial da União 25 out 2016; seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Brasília: Ministério da Saúde; 2010

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

BRENNER, F W et al. GUEST COMMENTARY *Salmonella* Nomenclature. **Journal of clinical microbiology**. 2000. <http://jcm.asm.org/>.

BRESSAN, M. C.; BERAQUET, N. J. Efeito de fatores pré-abate sobre a qualidade da carne de peito de frango. Campinas: **Revista Ciência e Agrotecnologia**, vol.26, n.5, p.1049-1059, 2002.

BRUCKNER, Stefanie et al. Characterization and Comparison of Spoilage Processes in Fresh Pork and Poultry. **Journal of Food Quality**, v.35, n.5, p.372–382, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2012.00456.x>

CARCIOFI, B. A. M.; LAURINDO, J. B. Water Uptake by Poultry Carcasses during Cooling by Water Immersion. **Chemical Engineering and Processing**, vol.46, p.444– 450, 2007.

CAO, Xinang; HUANG, Runze; CHEN, Haiqiang. Evaluation of pulsed light treatments on inactivation of *Salmonella* on blueberries and its impact on shelf-life and quality attributes. **International Journal of Food Microbiology** v.260, p.17–26, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.012>

CARRIQUE-MAS, J. J.; DAVIES, R. H. Sampling and bacteriological detection of *Salmonella* in poultry and poultry premises: a review. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 27, n. 3, p. 665–677, 2008. <https://doi.org/10.20506/rst.27.3.1829>

CASSAR J. R. & MILLS E. & CAMPBELL J. & DEMIRCI A., “Decontamination of Chicken Thigh Meat by Pulsed Ultraviolet Light”, *Meat and Muscle Biology* 3(1). p.479–487, 2019. doi: <https://doi.org/10.22175/mmb2019.08.0033>

CASTELLINI, C.; MUNGAI, C.; DAL BOSCO, A. Effect of organic production system on broiler carcass and meat quality. *Meat Science*, v. 60, n.3, p. 219- 225, 2002

CDC. Center for Emerging, CDC., & Infectious Diseases, Z. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella Annual Report*, 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance summaries. MMWR 45(No. SS-5). 1996. [https:// www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00044241.htm](https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00044241.htm) (acesso 29 set. 2019)

CHEIGH, Chan Ick; HWANG, Hee Jeong; CHUNG, Myong Soo. Intense pulsed light (IPL) and UV-C treatments for inactivating *Listeria monocytogenes* on solid medium and seafoods. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 745–752, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.025>

CQ PRESS. Farm Service Agency. **Federal Regulatory Guide**, v. 83, n. 218, p. 599–606, 2020. <https://doi.org/10.4135/9781544377230.n45>

DE MORAES, J. O.; HILTON, S. T.; MORARU, C. I. The effect of Pulsed Light and starch films with antimicrobials on *Listeria innocua* and the quality of sliced cheddar cheese during refrigerated storage. **Food Control**, v. 112, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107134>

DE MORAES, Jaqueline O., MORARU, Carmen I. **Alternatives to Conventional Food Processing: Edition 2_ Chapter 9** - High-intensity Pulsed Light Processing, Pages 355 – 396. 2018. <https://doi.org/10.1039/9781782626596-00355>

DEMIRCI, A.; PANICO, L. Pulsed ultraviolet light. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 5, p. 443–446, 2008. <https://doi.org/10.1177/1082013208098816>

DHAR, R., & Chakraborty, S. Influence of voltage and distance on quality attributes of mixed fruit beverage during pulsed light treatment and kinetic modeling. *Journal of Food Process Engineering*, 43(11), 2020. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13517>

DUGATTO, Jonas Simon et al. Qualidade de sobrecoxas de frangos submetidas à radiação UV-C. 2012.

DUNN, J., Ott, T., & Clark, W. Pulsed-light treatment of food and packaging. **Food Technology**, 49(9), 95–98. 1995.

DYCE, K. M., SACK, W. O., WENSING, C. J., Rodríguez Veiga, E., & Camón Urgel, J. *Anatomía veterinaria*. 2004.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Qualidade da carne das aves. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Publicado em: 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-de-aves>. Acesso: maio 2021.

ELMNASSER, N., GUILLOU, S., LEROI, F., ORANGE, N., Bakhrouf, A., & Federighi, M. Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: A review. **Canadian Journal of Microbiology**. vol. 53, Issue 7, pp. 813–821, 2007. <https://doi.org/10.1139/W07-042>

ESKIN JULIANA RUZANTE, Sandra et al. **Meat and Poultry Inspection 2.0 Safe food project in the Public Interest External reviewers**. 2014.

FÀBREGA, A., & VILA, J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, 308–341, 2013. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12>

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat>. Acesso em: 20 junho. 2021.

FINE, F.; GERVAIS, P. Efficiency of pulsed UV light for microbial decontamination of food powders. **Journal of Food Protection**, v.67, n.4, p.787–792, 2004. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.4.787>

FOLEY, S. L., Nayak, R., HANNING, I. B., Johnson, T. J., HAN, J., & Ricke, S. C. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, 4273–4279, 2011. <https://doi.org/10.1128/AEM.00598-11>

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2013.

FRANCO, G. Tabela de composição química dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 9 ed., 2004

FRANCO, A. S. M. A avicultura no Brasil. Rio de Janeiro: Revista Análise Conjuntural, vol.39, n.1-2, 2017.

FRAZIER, W.C. Microbiologia de los alimentos. 4 ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 511p.

GANAN, Monica et al. Use of pulsed light to increase the safety of ready-to-eat cured meat products. **Food Control**, v.32, n.2, p.512–517, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.022>

GÓMEZ-LÓPEZ, Vicente M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., & Debevere, J. Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. **Journal of applied microbiology**, 460–470, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02641.x>

GÓMEZ-LÓPEZ, Vicente M., RAGAERT, P., Debevere, J., & DEVLIEGHERE, F. Pulsed light for food decontamination: a review. **Trends in Food Science and Technology**, 464–473, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.03.010>

GÓMEZ-LÓPEZ, Vicente M.; BOLTON, James R. An Approach to Standardize Methods for Fluence Determination in Bench-Scale Pulsed Light Experiments. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 6, p. 1040–1048, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1696-z>

GUERRERO-BELTRÁN, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. v. Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. **Food Science and Technology International** Vol. 10, Issue 3, pp. 137–147, 2004. <https://doi.org/10.1177/1082013204044359>

GUERRERO-BELTRÁN, J. A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. v. **Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light**. 2004. <https://doi.org/10.1177/1082013204044359>

GRIMONT, Patrick A D; WEILL, François-Xavier **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 9th edition**. 2007.

HAUGHTON, P. N., Lyng, J. G., CRONIN, D. A., MORGAN, D. J., FANNING, S., & WHYTE, P. Efficacy of UV light treatment for the microbiological decontamination of chicken, associated packaging, and contact surfaces. **Journal of Food Protection**, 74(4), 565–572, 2011. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-356>

HAYES, P.R. *Microbiología y higiene de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1993. 369p.

HEINRICH, V., ZUNABOVIC, M., VARZAKAS, T., BERGMAIR, J., & KNEIFEL, W. Pulsed Light Treatment of Different Food Types with a Special Focus on Meat: A Critical Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 56(4), 591–613, 2016. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.826174>

HEINRICH, Victoria et al. Pulsed Light Treatment of Different Food Types with a Special Focus on Meat: A Critical Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 591–613, 2016. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.826174>

HEINRICH, Victoria et al. post-packaging application of pulsed light for microbial decontamination of solid foods: a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 30, p. 145–156, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.06.005>

HEREDIA, Norma et al. **Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control** **Meat products: main pathogens and non-thermal control strategies**. 2014.

HIERRO, E., Manzano, S., Ordóñez, J. A., de la Hoz, L., & Fernández, M. (2009). Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light

technology. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 125-130. 9
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.034>

HIERRO, Eva et al. Pulsed light treatment for the inactivation of selected pathogens and the shelf-life extension of beef and tuna carpaccio. **International Journal of Food Microbiology**, v.158, n. 1, p. 42–48,2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.018>

HILTON, S. T.; DE MORAES, Jaqueline O.; MORARU, Carmen. I. Effect of sublethal temperatures on pulsed light inactivation of bacteria. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.39, n.607, p.49–54, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.11.002>

HSU, Lillian; MORARU, Carmen I. Quantifying and mapping the spatial distribution of fluence inside a pulsed light treatment chamber and various liquid substrates. **Journal of Food Engineering**, v103, p. 84–91, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.002>

HUANG, R. Development and evaluation of a water-assisted decontamination system of pulsed light or ultraviolet for inactivation of *Salmonella* on fresh produce, 2108.
<http://udspace.udel.edu/handle/19716/23931>

IFSAC. Interagency Food Safety Analytics Collaboration. Foodborne illness source attribution estimates for 2018 for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria Monocytogenes*, and *Campylobacter* using multi-year outbreak surveillance data, United States. GA and D.C.: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture’s Food Safety and Inspection Service. 2020.

ISO 6579-1. International Organization for Standardization. Microbiology of the food chain: horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*, part 1: detection of *Salmonella* spp. Genebra, 2017.

KEKLIK, N. M., DEMIRCI, A., & PURI, V. M. Decontamination of unpackaged and vacuum-packaged boneless chicken breast with pulsed ultraviolet light. **Poultry Science**, 89(3), 570–581, 2010. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00476>

KEKLIK, N. M., KRISHNAMURTHY, K., & DEMIRCI, A. Microbial decontamination of food by ultraviolet (UV) and pulsed UV light. **Novel Methods and Applications**. p. 344–369, 2012. <https://doi.org/10.1533/9780857095756.2.344>

KEKLIK, N. M.; DEMIRCI, A.; PURI, V. M. (2009) Inactivation of listeria monocytogenes on unpackaged and vacuum-packaged chicken frankfurters using pulsed UV-light. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 8. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01319.x>

KEKLIK, N.M., A. DEMIRCI, and R.G. BOCK. Surface decontamination of whole chicken carcasses using a pilot scale pulsed UV light system. 2011. Trans. ASABE 54:993–1000. doi:10.13031/2013.37083

KOUTCHMA, Tatiana. UV light for processing foods. **Ozone: Science and Engineering**, v.30, n.1, p93–98, 2008. <https://doi.org/10.1080/01919510701816346>

KRAMER, B.; WUNDERLICH, J.; MURANYI, P. Pulsed light decontamination of endive salad and mung bean sprouts and impact on color and respiration activity. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 2, p. 340–348, 2015. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-262>

KRAMER, B., WUNDERLICH, J., & MURANYI, P. Recent findings in pulsed light disinfection. **Journal of Applied Microbiology**, 830–856, 2017. <https://doi.org/10.1111/jam.13389>

KRISHNAMURTHY, Kathiravan; DEMIRCI, Ali; IRUDAYARAJ, Joseph. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by pulsed UV-light sterilization. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1027–1030, 2004. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.5.1027>

LASAGABASTER, Amaia; DE MARAÑÓN, Iñigo Martínez. Impact of process parameters on *Listeria innocua* inactivation kinetics by pulsed light technology. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 7, p. 1828-1836, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0855-0>

LAWRIE, R. Meat Science. 2nd. ed. Oxford: Pergamon Press, 1974. 149p.

LEVY, Caroline et al. Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 168–174, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.022>

LORETZ, Marianne; STEPHAN, Roger; ZWEIFEL, Claudio. Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: A literature survey. **Food Control**, V. 21, Issue 6, p. 791-804, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.11.007>

LUBER, Petra. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs - which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1–2, p. 21–28, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.012>

LUKSIENE, Z., Gudelis, V., BUCHOVEC, I., & RAUDELUNIENE, J. (2007). Advanced high-power pulsed light device to decontaminate food from pathogens: Effects on *Salmonella typhimurium* viability in vitro. **Journal of Applied Microbiology**, 1545–1552, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03403.x>

LUSTOSA, Alane Gomes et al. Aspectos gerais de infecções por bactérias do gênero *Salmonella*, um problema de saúde pública e animal. **Research, Society and Development**. v. 10, n. 4, p. e12610413656, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13656>

LYON, S. A.; FLETCHER, D. L.; BERRANG, M. E. Germicidal ultraviolet light to lower numbers of *Listeria monocytogenes* on broiler breast fillets. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p. 964–967, 2007. <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.964>

MACGREGOR, S. J., ROWAN, N. J., MCILVANEY, L., Anderson, J. G., FOURACRE, R. A., Farish, O., & Farish, O. Light inactivation of food-related pathogenic bacteria using a pulsed power source. **Letters in Applied Microbiology**, 67-70, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1998.00399.x>

MAÑAS, Pilar; PAGÁN, R. Microbial inactivation by new technologies of food preservation. **Journal of Applied Microbiology**, 1387–1399, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02561.x>

MANDAL, R., MOHAMMADI, X., WIKTOR, A., SINGH, A., & SINGH, A. P. Applications of pulsed light decontamination technology in food processing: An overview. **Applied Sciences (Switzerland)**, 10(10), 2020. <https://doi.org/10.3390/app10103606>

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 713–721, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>

MCLEOD, A., HOVDE Liland, K., HAUGEN, J. E., SØRHEIM, O., MYHRER, K. S., & HOLCK, A. L. Chicken fillets subjected to UV-C and pulsed UV light: Reduction of pathogenic and spoilage bacteria, and changes in sensory quality. **Journal of Food Safety**, 38(1), 2018. <https://doi.org/10.1111/jfs.12421>

MEAD, G. C. Shelf-life and spoilage of poultry meat. **Woodhead Publishing Limited**. 2004. <https://doi.org/10.1533/9781855739031.283>

MORARU, C. I. High-Intensity pulsed light food processing. **RSC Green Chemistry**, 367–387, 2011. <https://doi.org/10.1039/9781849730976-00367>

MORARU, C.I., Uesugi, A.R., Pulsed-light treatment. Principles and applications. Koutchma, T., Forney, L.J., Moraru, C.I. (Eds.), *Ultraviolet Light in Food Technology*. CRC Press, Boca Raton, FL, 235–265 outlook and challenges. **World's Poultry Science Journal**, 73(2), 245–256, 2009. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000071>

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: Current state and future outlook and challenges. **World's Poultry Science Journal**.v73, p.245–256, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000071>

MUKHOPADHYAY, Sudarsan; RAMASWAMY, Raghupathy. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 666–677, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.016>

MURPHY, R. Y. et al. Thermal inactivation D- and Z-values of *Salmonella* and *Listeria innocua* in fully cooked and vacuum packaged chicken breast meat during postcook heat treatment. **Poultry Science**, v. 81, n. 10, p. 1578–1583, 2002. <https://doi.org/10.1093/ps/81.10.1578>

MURPHY, R. Y. et al. (2004) Thermal inactivation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground chicken thigh/leg meat and skin. **Poultry Science**, v. 83, n. 7, p. 1218–1225, 2004. <https://doi.org/10.1093/ps/83.7.1218>

NAUTA, M., VAN DER FELLS-KLERX, I., & HAVELAAR, A. A poultry-processing model for quantitative microbiological risk assessment. **Risk Analysis**. Vol. 25, Issue 1, pp. 85–98, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.0272-4332.2005.00569.x>

NICORESCU, I. et al. Effects of pulsed light on the organoleptic properties and shelf-life extension of pork and salmon. **Food Control**, v. 44, p. 138–145, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.052>

NIKPAY, Amir Abbas et al. Using failure mode and effect analysis (FMEA) in the risk analysis of industrial poultry production for decreasing threats of poultry by analyzing points of failure. **International Journal of Poultry Science** v. 13, n. 12, p. 718–728, 2014. <https://doi.org/10.3923/ijps.2014.718.728>

NYCHAS, George John E. et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v. 78, n. 1–2, p. 77–89, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>

OLIVO. **O mundo do frango: cadeia produtiva da carne de frango**. Ed. do Autor, 2006.

OMS-OLIU, Gemma; MARTÍN-BELLOSO, Olga; SOLIVA-FORTUNY, Robert. **Pulsed light treatments for food preservation. A review**. 2010. <https://doi.org/10.1007/s11947-008-0147-x>

ORLOWSKA, Marta et al. Continuous and Pulsed Ultraviolet Light for Nonthermal Treatment of Liquid Foods. Part 1: Effects on Quality of Fructose Solution, Apple Juice, and Milk. **Food and Bioprocess Technology**, v.6, n.6, p.1580–1592, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0779-8>

PANZENHAGEN, P. H. N., Paul, N. C., Junior, C. A. C., Costa, R. G., Rodrigues, D. P., & Shah, D. H. Genetically distinct lineages of *Salmonella* Typhimurium ST313 and ST19 are present in Brazil. **International Journal of Medical Microbiology**, 308(2), 306-316, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.01.005>

PASKEVICIUTE, E.; BUCHOVEC, I.; LUKSIENE, Z. High-Power Pulsed Light for Decontamination of Chicken from Food Pathogens: A Study on Antimicrobial Efficiency and Organoleptic Properties. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 1, p. 61–68, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2010.00267.x>

PEDRÓS-GARRIDO, S. et al. Efficacy of ultraviolet light (UV-C) and pulsed light (PL) for the microbiological decontamination of raw salmon (*Salmo salar*) and food contact surface materials. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 50, p. 124–131, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.10.001>

PETRACCI, M.; FLETCHER, D. L. Broiler skin and meat color changes during storage. **Poultry Science**, v. 81, n. 10, p. 1589-1597, 2002.

POLLOCK, Allison M. et al. Pulsed light destruction kinetics of *L. monocytogenes*. **LWT - Food Science and Technology**, v84, p. 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.040>

QUIROGA, A. L. B. Proteínas: dossiê proteínas. São Paulo: **Revista Food Ingredients Brasil**, n.22, 2012.

RAJKOVIC, A.; SMIGIC, Nada; DEVLIEGHERE, Frank. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. SUPPL., p. S29–S42, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.019>

RAMASWAM, John D, et al. Pulsed light technology to enhance food safety and quality: a mini-review, **Current Opinion in Food Science**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.06.004>

ROÇA, R. O. Composição química da carne. Botucatu: UNESP, Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, 2008.

ROÇA, R. O. Propriedades da carne. Botucatu: UNESP, Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, 2009.

RINGUS, Daina L.; MORARU, Carmen I. Pulsed Light inactivation of *Listeria innocua* on food packaging materials of different surface roughness and reflectivity. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 331–337, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.022>

ROGERS, L. L. Sensory methods for quality control. In: **Sensory analysis for food and beverage quality control**. Woodhead Publishing, 2010. p. 51-74.

ROWAN, N J, MACGREGOR, S. J., Anderson, J. G., FOURACRE, R. A., MCILVANEY, L., & Farish, A. O. Pulsed-Light Inactivation of Food-Related Microorganisms. **Applied and environmental microbiology**, 1312-1315, 1999. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1312-1315.1999>.

ROWAN, Neil J. Pulsed light as an emerging technology to cause disruption for food and adjacent industries – Quo vadis? **Trends in Food Science and Technology**, 316–332, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.027>

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI, K. S.; SILVA, L. C. **Abate das Aves**. Boletim Técnico. Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória: 2007.

SCALLAN, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. v., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, 7–15, 2011. <https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>

SCHAEFER, R., GRAPPERHAUS, M., SCHAEFER, L., & LINDEN, K. Pulsed UV lamp performance and comparison with UV mercury lamps. **Journal of Environmental Engineering and Science**, v. 6, n. 3, p. 303–310, 2007. <https://doi.org/10.1139/S06-068>

SCHOTTROFF, Felix et al. Sublethal injury and Viable but Non-culturable (VBNC) state in microorganisms during preservation of food and biological materials by non-thermal processes. **Frontiers Media S.A.**, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02773>

SHAO, Yujing; GUO, Yuming; WANG, Zhong. Chickens challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. p. 1764–1773, 2011.

SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R. Carnes PSE em frangos. Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes, ed. **Varela, São Paulo**, p. 95-104, 2006.

SIMÃO, Raquel da Silva, DE MORAES, Jaqueline Oliveira, MONTEIRO, Ricardo Lemos, SCHAIDT, Ana Lúcia, CARCIOFI, Bruno Augusto Mattar, LAURINDO, João Borges. Conductive drying methods for producing high-quality restructured pineapple-starch snacks, **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Volume 70, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102701>.

SOUZA, X. R. Características de carcaça, qualidade de carne e composição lipídica de frangos de corte criados em sistema de produção caipira e convencional. Universidade Federal da Lavras, Lavras, 2004.

THAMES, Hudson T.; SUKUMARAN, Anuraj Theradiyil. A review of *Salmonella* and *Campylobacter* in broiler meat: Emerging challenges and food safety measures. **Foods**, v. 9, n. 6, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9060776>

TOMASEVIC, I., Djekic, I., Novaković, S., Barba, F., & Lorenzo, J. M. The feasibility of pulsed light processing in the meat industry. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, 333(1), 2019. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/333/1/012034>

TOMASEVIC, Igor. Intense light pulses upset the sensory quality of meat products. **Meat Technol** 2015, 56:1-7

TOZZO, Kamila, NETO, Américo F.G., SPERCOSKI, Katherinne, RONNAU, Milton, SOARES, Vanessa M. BERSOT, Luciano S., Migration of *Salmonella* serotypes Heidelberg and Enteritidis in previously frozen chicken breast meat, *Food Microbiology*, Volume 69, Pages 204-211, 2018, ISSN 0740-0020, <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.07.021>.

UESUGI, Aaron R.; MORARU, Carmen I. Reduction of *Listeria* on ready-to-eat sausages after exposure to a combination of Pulsed light and nisin. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 2, p. 347–353, 2009. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.2.347>

UESUGI, Aaron R.; WOODLING, Sarah E.; MORARU, Carmen I. Inactivation kinetics and factors of variability in the pulsed light treatment of *Listeria innocua* cells. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 11, p. 2518–2525, 2007. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.11.2518>

VAN IMPE, J. et al. State of the art of nonthermal and thermal processing for inactivation of micro-organisms. **Blackwell Publishing Ltd**, 2018. <https://doi.org/10.1111/jam.13751>

VENTURINI, Katiani Silva; SARCINELLI, Miryelle Freire; SILVA, LC da. Características da carne de frango. **Boletim Técnico-Pie-Ufes**, v. 1307, 2007.

WAMBURA, Peter; VERGHESE, Martha. Effect of pulsed ultraviolet light on quality of sliced ham. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2173–2179, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.016>

WEKHOF, A. Disinfection with flash lamps. **PDA journal of pharmaceutical science and technology / PDA**. v. 54, n. 3, p. 264–276, 2000.

WHELAN, Victoria J. Difference from control (DFC) test. In: **Discrimination Testing in Sensory Science**. Woodhead Publishing, 2017. p. 209-236.

WOODLING, Sarah E; MORARU, Carmen I. Effect of Spectral Range in Surface Inactivation of *Listeria innocua* Using Broad-Spectrum Pulsed Light **Journal of Food Protection**. 70(4), 909-916.,2007.<https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.4.909>

YORK, New. Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities - ICSMF - **Microorganisms in Foods**. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: 2005.