



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TAIS APARECIDA DO NASCIMENTO

**INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE LUZ PULSADA E  
INTERAÇÃO SUBSTRATO-MICROORGANISMOS NA INATIVAÇÃO DE  
*SALMONELLA* EM PEITO DE FRANGO**

Florianópolis

2023

Tais Aparecida do Nascimento

**INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE LUZ PULSADA E  
INTERAÇÃO SUBSTRATO-MICROORGANISMOS NA INATIVAÇÃO DE  
*SALMONELLA* EM PEITO DE FRANGO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. João Borges Laurindo

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Coorientadora: Dra. Jaqueline Oliveira de Moraes

Florianópolis

2023

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

Nascimento , Tais Aparecida do  
INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE LUZ PULSADA E  
INTERAÇÃO SUBSTRATO-MICROORGANISMOS NA INATIVAÇÃO DE  
SALMONELLA EM PEITO DE FRANGO / Tais Aparecida do  
Nascimento ; orientador, João Borges Laurindo ,  
coorientador, Bruno Augusto Mattar Carciofi ,  
coorientador, Jaqueline Oliveira de Moraes, 2023.  
90 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Microbiologia . 3.  
Inativação. 4. Salmonella. I. Laurindo , João Borges. II.  
Carciofi , Bruno Augusto Mattar . III. Moraes, Jaqueline  
Oliveira de IV. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. V.  
Título.

TAIS APARECIDA DO NASCIMENTO  
**INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO PROCESSO DE LUZ PULSADA E  
INTERAÇÃO SUBSTRATO-MICROORGANISMOS NA INATIVAÇÃO DE  
*SALMONELLA* EM PEITO DE FRANGO**

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

Prof. Dr. João Borges Laurindo – Presidente -UFSC

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Jaciane Lutz Ienczak – Membro Interno -UFSC

Dr<sup>a</sup> Daniela Torquato Mengarda Buosi – Membro Externo

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

---

Profa. Dra Sandra Regina Salvador Ferreira  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. João Borges Laurindo  
Orientador

Florianópolis, 2023.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. João, pela disposição, pela paciência e ensinamentos durante o período de pós-graduação e da realização deste trabalho. Sua competência é de grande inspiração.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Bruno, por acreditar na minha capacidade e por confiar em mim em um projeto de extrema importância, pelo exemplo profissional e por estar sempre disposto a ajudar.

À minha coorientadora Dr<sup>a</sup>. Jaqueline, por se fazer presente em todas as ocasiões, pelo auxílio, conversas e ensinamentos. Seu amor pela ciência e sua alegria fizeram diferença nos meus dias.

Aos meus pais, Silvania e Nilson, que sempre acreditaram no meu potencial, por todos os conselhos, amor e dedicação. Por sempre estarem presentes e por entenderem minha ausência.

Ao meu querido primo Hermes Bastregghi (in memoriam), exemplo de ser humano e bondade.

À Kalisy, minha companheira fiel do laboratório, sua ajuda foi imprescindível para a realização deste trabalho. Pelos dias e noites de ajuda, por ser proativa e não medir esforços.

Por fim, pela amizade, carinho, conversas e risadas que levarei sempre comigo.

À minha amiga Ana Massia, por sempre me escutar e ter uma palavra de carinho. Por todos os momentos dentro e fora do laboratório. Por sua amizade e compreensão.

À Dr<sup>a</sup> Denise e ao Dr. Ricardo Lemos, pela paciência, ensinamentos e conversas. Por me acompanhar no laboratório, por toda ajuda, pelas sugestões que agregaram ao longo deste trabalho. Pelo carinho e amizade.

À Dr<sup>a</sup>. Daniela Mengarda, por todo conhecimento transferido, pela ajuda e troca de experiências.

À Sandra Seo, pela ajuda no trabalho e pela amizade desenvolvida neste tempo. Pela atenção e cuidado, pela pessoa maravilhosa que é e pela energia que transmite.

À todos os colegas dos laboratórios LIEB e PROFI, pela ajuda e ensinamentos.

À todas as pessoas que contribuíram e acreditaram na realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC.

À BRF pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao CNPQ, pela concessão da bolsa de estudos no início deste trabalho.

## RESUMO

A Salmonelose é uma doença bacteriana causada por *Salmonella*, comumente transmitida pela ingestão de alimentos contaminados. Essas bactérias são termosensíveis e podem ser inativadas por tratamento térmico, que pode modificar a matéria prima *in natura*. A luz pulsada de alta energia é um tratamento não térmico utilizado para inativar microrganismos, sem modificar a matéria prima. O objetivo deste estudo foi avaliar as influências dos parâmetros de processo e das interações bactéria-substrato na inativação de *Salmonella* Typhimurium em peito de frango tratado com luz pulsada. As amostras foram cortadas, inoculadas e submetidas ao tratamento com luz pulsada a uma distância de 6,03 cm da lâmpada. Foram avaliadas as influências da concentração do inóculo ( $10^3$  a  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>, das fluências de 1,91 e 5,63 J/cm<sup>2</sup>, dos tempos de internalização de 1, 5, 15 e 60 min, dos volumes do inóculo (5 e 50 µL) e da presença de uma camada de água sobre a superfície antes da inoculação. As reduções das cargas microbianas nos peitos de frango foram determinadas por comparação entre amostras não tratadas e tratadas. As reduções microbianas foram independentes da concentração do inóculo, mas maiores reduções ocorreram para maiores fluências. O tempo decorrido entre a inoculação e o tratamento por luz pulsada influenciou negativamente a inativação, indicando que parte das bactérias migraram para locais em que a luz pulsada não agiu; o aumento do tempo de migração de 5 para 15 min reduziu a inativação decimal de  $3,22 \pm 0,53$  para  $1,41 \pm 0,18$ . O volume do inóculo exerceu influência sobre a inativação, para os tempos de migração iguais a 1 e 15 min, o que não foi observado para 5 min. A inativação foi de  $2,62 \pm 0,42$  log UFC/cm<sup>2</sup> nas amostras inoculadas com 50 µL, 1 min após a inoculação, enquanto não houve detecção nas amostras inoculadas com 5 µL. Para o tempo de 15 min a inativação foi de  $1,41 \pm 0,18$  e  $2,11 \pm 0,71$  log UFC/cm<sup>2</sup> para os volumes de 50 e 5 µL, respectivamente. Também foi observado que maiores inativações ocorreram na ausência de uma camada de água sobre as amostras, que atuou direta ou indiretamente como um fator de proteção para as bactérias. Os resultados apresentados indicam que a aplicação da luz pulsada reduz a carga de *Salmonella* em peitos de frango. Para uma aplicação bem sucedida, é necessário conhecer as interações entre os microrganismos e a superfície de um alimento, e os consequentes efeitos sobre a efetividade da luz pulsada.

**Palavras-chave:** Tecnologia não térmica, Segurança de Alimentos, Contaminação cruzada, Carnes de aves.

## ABSTRACT

Salmonellosis is a bacterial disease caused by *Salmonella*, commonly transmitted by eating contaminated food. These bacteria are thermosensitive and can be inactivated by heat treatment, which can modify the raw material. High-energy pulsed light is a non-thermal treatment used to inactivate microorganisms without changing the raw material. The objective of this study was to evaluate the influences of process parameters and bacteria-substrate interactions on the inactivation of *Salmonella* Typhimurium in chicken breasts treated with pulsed light. The samples were cut, inoculated and subjected to treatment with pulsed light at a distance of 6.03 cm from the lamp. The influences of inoculum concentration ( $10^3$  to  $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>, fluences of 1.91 and 5.63 J/cm<sup>2</sup>, internalization times of 1, 5, 15 and 60 min, inoculum volumes (5 and 50  $\mu$ L) and the presence of a layer of water on the surface before inoculation. Reductions in microbial loads in chicken breasts were determined by comparing untreated and treated samples. Microbial reductions were independent of inoculum concentration, but more significant reductions occurred for higher fluences. The time between inoculation and pulsed light treatment negatively influenced inactivation, indicating that part of the bacteria migrated to sites where the pulsed light did not act; increasing the migration time from 5 to 15 min reduced the decimal reduction from  $3.22 \pm 0.53$  to  $1.41 \pm 0.18$ . The volume of the inoculum influenced the inactivation for migration times of 1 and 15 min, which was not observed for 5 min. The inactivation was  $2.62 \pm 0.42$  log CFU/cm<sup>2</sup> in samples inoculated with 50  $\mu$ L, 1 min after inoculation, while there was no detection in samples inoculated with 5  $\mu$ L. For the time of 15 min, the inactivation was  $1.41 \pm 0.18$  and  $2.11 \pm 0.71$  log CFU/cm<sup>2</sup> for the 50 and 5  $\mu$ L volumes, respectively. It was also observed that more significant inactivation occurred in the absence of a water layer over the samples, which acted directly or indirectly as a protective factor for the bacteria. The presented results indicate that applying pulsed light reduces the *Salmonella* load in chicken breasts. For a successful application, it is necessary to know the interactions between microorganisms and the food surface and the consequent effects on the effectiveness of the pulsed light.

**Keywords:** Non-thermal Technology, Food Safety, Cross-contamination, Poultry meat

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma simplificado para o processamento da carne de frango.....	19
Figura 2- Equipamento de luz pulsada da Xenon, modelo X-1100. A fotografia da parte superior é uma visão geral do equipamento. Na parte inferior são mostradas: Câmara de tratamento (1), Exaustor (2) e Painel de controle (3). .....	30
Figura 3 - Radiômetro utilizado para medir as fluências em função dos parâmetros de operação e da posição da amostra no interior da câmara de tratamento.....	32
Figura 4 – Câmara de tratamento por LP, com a bandeja em diferentes níveis.....	33
Figura 5 – Posições horizontais do radiômetro. ....	34
Figura 6 – Etapas do preparo da ativação da bactéria. ....	35
Figura 7 - Preparo da solução bacteriana. ....	36
Figura 8 – Amostras de filé de peito de frango cortadas.....	36
Figura 9 – Preparo das diferentes concentrações de inóculo.....	38
Figura 10 – Amostras submetidas a imersão antes do processo de luz pulsada.....	39
Figura 11 – Contagem das UFC de <i>Salmonella</i> em placas de Petri.....	41
Figura 12 - Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 5,15 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento espacial da fluência na camara de luz pulsada. ....	44
Figura 13 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulso ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 5,15 cm , gerado a partir do planejamento experimental.....	47
Figura 14 – Amostras submetidas a inoculação com corante para os tratamentos A) sem e B) com imersão. ....	55
Figura 16 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulsos ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 4,79 cm , gerado a partir do planejamento experimental.....	69
Figura 17- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 6,41 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da camara de luz pulsada. ....	72

Figura 18 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulso ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 6,41 cm, gerado a partir do planejamento experimental.....	73
Figura 19- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 7,79 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da câmara de luz pulsada. ....	76
Figura 20 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulsos ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 7,79 cm, gerado a partir do planejamento experimental.....	77
Figura 21- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 9,50 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da camara de luz pulsada. ....	80
Figura 22- Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulsos ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 9,50 cm, gerado a partir do planejamento experimental.....	81
Figura 23- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 10,27 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da camara de luz pulsada. ....	84
Figura 24 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulso ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 10,27 cm, gerado a partir do planejamento experimental.....	85
Figura 25- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 11,5 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da câmara de luz pulsada. ....	88
Figura 26 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulso ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 11,50 cm, gerado a partir do planejamento experimental.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Domínio experimental com variáveis utilizadas no planejamento.....	33
Tabela 2 - Mapeamento na distância 5,15 cm. ....	43
Tabela 3 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 5,15 cm. ....	45
Tabela 4 - Redução logarítmica em diferentes concentrações e fluências. ....	48
Tabela 11 - Mapeamento na distância de 4,79 cm. ....	66
Tabela 12 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 4,79 cm. ....	67
Tabela 13 - Mapeamento na distância de 6,41 cm. ....	70
Tabela 14 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 6,41 cm. ....	71
Tabela 15 - Mapeamento na distância de 7,79 cm. ....	74
Tabela 16 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 7,79 cm. ....	75
Tabela 17 - Mapeamento na distância de 9,50 cm. ....	78
Tabela 18 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 9,50 cm. ....	79
Tabela 19 - Mapeamento na distância de 10,27 cm. ....	82
Tabela 20 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 10,27 cm. ....	83
Tabela 21 - Mapeamento na distância de 11,5 cm. ....	86
Tabela 22 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 11,50 cm. ....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal  
ATCC – American Type Culture Collection  
BHI – Brain Heart Infusion  
B.O.D – Estufa incubadora com controle de temperatura  
CDC – Centers for Disease Control and Prevention  
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos  
EFSA – European Food Safety Authority  
FDA – Food and Drug Administration  
IFSAC – Interagency Food Safety Analytics Collaboration  
ISO – International Standard Organization  
IN – Instrução Normativa  
J – Joule  
LP – Luz Pulsada  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
N – População microbiana  
 $N_0$  – População microbiana inicial  
TSA – Tryptic Soy Agar  
TSB – Tryptic Soy Broth  
UFC – Unidade Formadora de Colônia

## DIAGRAMA CONCEITUAL DO ESTUDO

### INATIVAÇÃO DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM PEITO DE FRANGO POR LUZ PULSADA DE ALTA ENERGIA: PARÂMETROS DE PROCESSO E INTERAÇÃO ENTRE SUBSTRATO E MICRORGANISMO

#### Por quê?

- O peito de frango é uma proteína animal de grande consumo em todo o mundo, com potencial para causar surtos de infecção alimentar;
- A luz pulsada de alta energia (LP) é uma tecnologia não-térmica, rápida, livre de resíduos e promissora para a inativação de microrganismos em produtos cárneos;
- Conhecer a relação entre as condições de operação do sistema de luz pulsada e sua efetividade na inativação de patógenos é crucial para aplicações industriais.

#### O que já foi feito?

- - Estudos sobre as sensibilidades de diferentes microrganismos à LP, considerando i) os efeitos da idade da população microbiana, ii) o desenvolvimento de resistência ao tratamento e efeitos sinérgicos, iii) o efeito da banda espectral da luz pulsada e de sua absorção pela superfície, iv) a influência do ambiente em que os microrganismos estão inseridos e v) os efeitos de sombreamento.
- A literatura aborda a aplicação de LP nas duas faces do peito de frango, mas faltam resultados sobre o impacto de diferentes condições de processo e concentrações de microrganismos na eficácia da inativação;
- Há poucos relatos sobre a inativação de *Salmonella* Typhimurium em peitos de frango por aplicação da LP.

#### Estratégia de investigação: Compreender o efeito das variáveis presentes

- Mapear a fluência no interior do equipamento de LP;
- Compreender a inativação da *Salmonella* Typhimurium utilizando diferentes doses de fluência e inóculo inicial;
- Compreender como filmes de água na superfície da amostra influenciam a inativação da *Salmonella* Typhimurium;
- Compreender como o tempo de contato inóculo-peito de frango antes da aplicação da LP influencia a inativação da *Salmonella* Typhimurium por LP.

#### Hipóteses da pesquisa

1. É possível reduzir a carga superficial de *Salmonella* pela aplicação de LP;
2. A concentração inicial de microrganismos presentes na superfície do produto interfere na redução associada à aplicação da LP;
3. O tempo de contato entre *S. Typhimurium* com o peito de frango antes do tratamento com LP modifica a redução;
4. O volume do inóculo e a presença de um filme de água na superfície do peito de frango influencia a inativação por LP.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1	OBJETIVOS .....	16
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>Revisão bibliográfica .....</b>	<b>17</b>
2.1	Carne de frango.....	17
<b>2.1.1</b>	<b>Produção da carne de frango.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Processamento da carne de frango.....</b>	<b>18</b>
2.2	<i>Salmonella</i> .....	22
<b>2.2.1</b>	<b>Características da <i>Salmonella</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Salmonelose .....</b>	<b>23</b>
2.3	Alternativas para a inativação de microrganismos em alimentos.....	24
2.4	Luz pulsada de alta energia (LP) .....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1	Material.....	28
3.2	Dispositivo de LP .....	29
3.3	Mapeamento da fluência no equipamento de luz pulsada .....	31
3.4	Preparo do inóculo .....	34
3.5	Preparo da amostra .....	36
3.6	Tratamento da superfície de frango de peito de frango com LP.....	37
3.7	Estudo da concentração do inóculo .....	37
3.8	Estudo do tempo de contato entre <i>Samonella</i> Typhimurium e peito de frango antes do tratamento com LP .....	38
3.9	Estudo do volume de inóculo sobre a superfície do peito de frango .....	38
3.10	Estudo da camada de água na superfície do frango .....	39

3.11	Avaliação do comportamento da gota de inóculo com diferentes condições da superfície da amostra de frango.....	40
3.12	Enumeração de células bacterianas sobreviventes .....	40
3.13	Análise estatística .....	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
4.1	Mapeamento da fluência no equipamento de LP.....	42
4.2	Influência da influência da concentração do inóculo na inativação por PL .....	48
4.3	Influência do tempo de contato inóculo-peito de frango antes do tratamento com LP 50	
4.4	Influência da dispersão das gotas de inóculo sobre a superfície do peito de frango 51	
4.5	Influência da camada de água na superfície do frango.....	53
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXO A – Resultado do planejamento experimental em diferentes parâmetros.....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Salmonelose é uma doença bacteriana causada por *Salmonella*, comumente transmitida pela ingestão de alimentos contaminados. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), a Salmonelose causa 1,35 milhões de infecções, 26.500 hospitalizações e 420 mortes nos Estados Unidos a cada ano (CDC, 2022a). Em pessoas saudáveis, a dose infecciosa é geralmente de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/g, mas contagens bacterianas mais baixas podem agravar doenças em crianças de 5 anos ou menos, adultos com mais de 65 anos e pessoas com sistema imunológico enfraquecido (CHEN et al., 2013). O CDC estima que a *Salmonella* causa mais doenças transmitidas por alimentos do que qualquer outra bactéria. A *Salmonella* pode ser encontrada em uma variedade de alimentos, incluindo frango, carne bovina, carne de porco, ovos, frutas, legumes e até alimentos processados. A carne de frango é uma das principais causadoras dessa doença, pois 1 em cada 25 pacotes de frango nos supermercados dos EUA estão contaminados com *Salmonella* (CDC, 2022b).

O constante aumento da produção e consumo de carne de frango traz uma grande preocupação com a segurança deste alimento, pois as aves possuem uma microbiota diversificada e são susceptíveis a contaminação nos processos industriais, desde o abate (ANDERSON et al., 2016; OECD-FAO, 2021). O controle da infecção por *Salmomella* têm sido um desafio para o setor avícola devido à alta tolerância ao estresse ambiental, ampla distribuição, resistência a múltiplas drogas e adaptabilidade (CHEN et al., 2013). A sua alta adaptabilidade está inteiramente relacionada com componentes da superfície celular bacteriana, como celulose, flagelos e fímbrias, que contribuem para a fixação da *Salmonella* em diferentes superfícies, com a formação de biofilmes (KROUPITSKI et al., 2009).

A grande dificuldade é que alimentos contaminados com *Salmonella* possuem aparência, gosto e cheiro normais, o que dificulta ainda mais a identificação das contaminações pelo consumidor. Além disso, a comida não é a única maneira da *Salmonella* se espalhar para as pessoas. A bactéria também se espalha através da água contaminada, do meio ambiente, de outras pessoas e animais (CDC, 2022b).

O sistema de produção de aves possui cadeias de suprimentos complexas, que apresentam muitas situações diferentes em que as aves e seus cortes podem ser contaminados (GOLDEN; ROTHROCK; MISHRA, 2021). As etapas da cadeia de produção e processamento da carne de frango consistem na produção primária nas granjas de criação, transporte até o

abate, processo de abate e posterior processamento dos produtos de carne de frango, venda dos produtos no varejo e manuseio e consumo de produtos de carne de frango em casa e em restaurantes (SKARP; HÄNNINEN; RAUTELIN, 2016).

O processo de industrialização mais simples consiste em três etapas principais, sendo iniciado pelo abate, seguido pela evisceração (remoção das vísceras) e embalagem. Na primeira etapa, os frangos são abatidos, sangrados e escaldados para facilitar a remoção das penas. Na segunda fase, as vísceras e cabeça são removidas e lavadas, obtendo-se as carcaças (LÓPEZ-ANDRÉS et al., 2018).

No geral, o processamento de aves é um ambiente propício para a contaminação das carcaças e cortes de frango com *Salmonella*, podendo ocorrer nas diversas etapas do processo, por contato com as superfícies dos equipamentos e pela manipulação pelos colaboradores (ASHRAFUDOULLA et al., 2021). No entanto, alguns estudos apontam que a contaminação por *Salmonella* geralmente é maior após a etapa de sangria. Amostragens ambientais realizadas no processamento de abate, mostram que a etapa de evisceração pode representar um risco de contaminação das carcaças de um mesmo lote e dos lotes posteriormente abatidos, o que se denomina como contaminação cruzada dos equipamentos e ambiente de processamento (BOUBENDIR et al., 2021). Rivera-Perez et al. (2014) destacam que os processos de evisceração e lavagem por pulverização representam um risco de contaminação cruzada das carcaças de frango por *Salmonella* durante o processamento.

A indústria de abate e processamento de aves já realiza diversas ações para o controle de *Salmonella* na cadeia produtiva. Além disso, pesquisas vêm sendo realizadas para produzir conhecimento que ajudem a aumentar a segurança dos alimentos processados (EL-SAADONY et al., 2022).

As tecnologias de processamento não térmico não utilizam o aquecimento como principal meio de inativação de microrganismos em produtos alimentícios, mantendo o produto próximo da temperatura do ambiente durante o processamento. Dentre as tecnologias não térmicas, a luz pulsada destaca-se por ser uma tecnologia limpa, que não gera resíduos na superfície tratada. Possui muitas aplicações potenciais na indústria de alimentos e pode ser utilizada como estratégia de intervenção ao longo das linhas de processamento, evitando ou reduzindo a contaminação cruzada entre o equipamento e o produto, aumentando a inocuidade e a vida útil dos alimentos tratados (MAHENDRAN et al., 2019a; RAJKOVIC et al., 2010). No entanto, é fundamental avaliar as condições de tratamento adequadas (número de flashes de

luz, voltagem, distância entre amostra e os flashes de luz, faixa espectral dos flashes de luz e contaminação) para cada alimento e microrganismo, para garantia a eficácia do tratamento (MAHENDRAN et al., 2019b).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo central deste estudo foi avaliar o impacto da aplicação de luz pulsada de alta energia na inativação de *Salmonella* Typhimurium na superfície de peitos de frango *in natura*, considerando variáveis ambientais e diferentes condições de processo.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Para atingir o objeto geral, foram definidos objetivos específicos de compreensão das influências das variáveis de processo e das condições ambientais que influenciam a letalidade da luz pulsada de alta energia. Como são objetivos de produção e conhecimento sobre o tema, eles estão associados às estratégias de investigação, ou seja:

1. Compreender como a fluência da luz pulsada impacta na inativação da *S. Typhimurium*;
2. Compreender como a concentração de *Salmonella* na superfície do peito de frango influencia na redução por LP;
3. Compreender como filmes de água na superfície da amostra influenciam a inativação da *S. Typhimurium* por LP;
4. Compreender como o tempo de contato inóculo-peito de frango antes da aplicação da LP influencia a inativação da *S. Typhimurium*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Carne de frango

#### 2.1.1 Produção da carne de frango

Em 2021, a produção mundial de carne de frango foi de aproximadamente 100 milhões de toneladas, sendo os maiores produtores os Estados Unidos, China e Brasil, com 20,378; 14,700 e 14,329 milhões de toneladas, respectivamente. De toda a produção brasileira, 68% foram destinadas ao mercado interno e 32% ao mercado externo. No Brasil, a região Sul é a maior produtora de carne de frango; os estados do Paraná (35,54%), Santa Catarina (14,89%) e Rio Grande do Sul (13,65%) totalizam 64,08% da produção nacional (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2022).

Segundo uma pesquisa realizada pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), a carne de frango é a proteína animal consumida igualmente em todas as classes sociais e 80% da população brasileira consome carne de frango de 2 a 3 vezes por semana. Este levantamento esclarece o aumento da produção nacional nos últimos 5 anos, de 5,37%, motivada pelo consumo per capita, que aumentou de 43,25 para 45,27 kg/hab entre 2015 e 2020 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2016, 2021).

Na próxima década, a produção de aves deverá aumentar 17% e toda a sua produção deverá responder por 52% do crescimento global da produção de carnes, sendo o Brasil responsável por 10% deste crescimento. O aumento da produção é reflexo da substituição da carne bovina e suína pela carne de aves, pois os consumidores a veem como um produto mais saudável e ambientalmente sustentável do que a carne bovina e a carne de porco (OECD-FAO, 2021).

Um resumo estatístico da avicultura e suinocultura brasileira reflete o aumento previsto; a produção de carne suína em 2021 foi de 4,701 milhões de toneladas, com valor bruto da produção igual a 31,3 bilhões de reais, com consumo per capita de 16,7 kg/hab e exportação para 86 países. Nesse mesmo ano a produção de carne de frango foi de 14,329 milhões de toneladas, com valor bruto igual 108,9 bilhões de reais, o consumo per capita foi de 45,56 kg/hab, além das exportações para 151 países (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2016, 2021). Como consequência deste aumento, o setor aviário contribui no sustento e qualidade de vida de agricultores, pessoas com baixa renda e no desenvolvimento socioeconômico de vários países (MOTTET; TEMPIO, 2017).

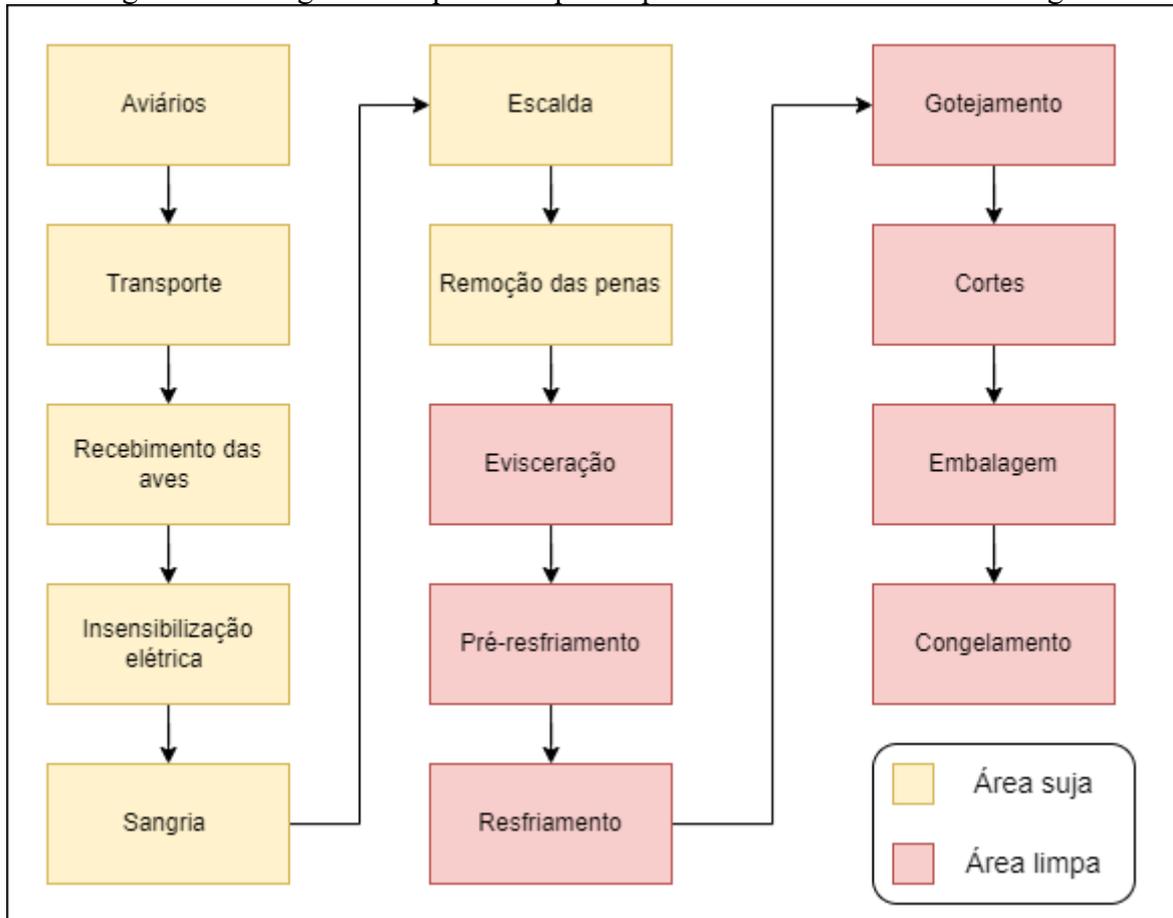
Além disso, a produção de carne de frango gera menos gases de efeito estufa ou equivalente de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A produção de 1 kg de carne de frango gera 1,1 kg CO<sub>2</sub> equivalente, o que é consideravelmente menor do que a produção de carne suína (3,8 kg CO<sub>2</sub> equivalentes) ou bovina (14,8 kg CO<sub>2</sub> equivalentes) (FIALA, 2008).

### 2.1.2 Processamento da carne de frango

As indústrias de abate e processamento de aves possuem grande relevância na cadeia produtiva de aves. Para atender o mercado consumidor, elas buscam mais agilidade, economia e qualidade em seus produtos e processos. O bem-estar animal e humano têm sido considerados nos processos adotados por essas indústrias (DUTRA et al., 2021). No entanto, a produção avícola possui uma cadeia de abastecimento complexa, que apresenta muitos momentos diferentes para as aves ou carne de frango serem contaminadas com patógenos de origem alimentar. Por essa razão, é importante entender os riscos envolvidos durante cada etapa da produção (GOLDEN; ROTHROCK; MISHRA, 2021).

Para garantir a inocuidade dos alimentos e com objetivo de minimizar a contaminação cruzada, as ações gerais de controle no nível do abatedouro abrangem a separação física das áreas sujas (recebimento das aves, insensibilização, sangria, escalda, remoção das penas) e limpas (evisceração, pré-resfriamento, resfriamento, gotejamento, cortes e embalagens), para impedir a mistura de funcionários, equipamentos e ou ferramentas e ar entre elas. Assim, a realização da limpeza e desinfecção pode ser realizada de acordo com o ambiente e suas necessidades (MANCINELLI et al., 2018; SOFOS; GEORNARAS, 2010). Portanto, a carne de frango não depende apenas dos cuidados e atenção no campo, mas também durante as etapas de pré-abate e abate das aves na indústria (GRANDIN, 2014). A Figura 1 apresenta o fluxograma simplificado usado no processamento de frangos.

Figura 1- Fluxograma simplificado para o processamento da carne de frango.



Fonte: Adaptado de Malmali et al., 2020

Os procedimentos pré-abate devem ser devidamente programados e executados para pequenas distâncias de transporte e duração da espera, com captura das aves preferencialmente à noite e com métodos adequados de captura e encaixotamento. Outro fator importante é a dieta hídrica das aves objetivando a limpeza do trato digestivo. A atenção e o controle de todos esses fatores são essenciais para garantir os padrões de bem-estar animal no transporte de frangos de corte (SARAIVA et al., 2020).

No abate, a operação inicia-se após o recebimento das aves, que passam por uma insensibilização elétrica, antes da incisão da sangria. O equipamento de insensibilização elétrica consiste em um banho de água salina, com passagem de corrente elétrica. As aves dependuradas pelos pés são transportadas e suas cabeças mergulhadas no banho, recebendo a corrente elétrica, que flui da cabeça para os pés. Após esse processo de insensibilização, as aves são abatidas por sangria, através de uma incisão na artéria e veia jugular. Em seguida, a escalda é utilizada para facilitar a retirada das penas (MALMALI et al., 2018).

O processo de escalda normalmente ocorre por imersão das carcaças em um tanque com água quente, etapa potencialmente preocupante para a contaminação cruzada, pois todas as carcaças de um dado lote entram em contato com o mesmo reservatório. Essa etapa também pode promover a contaminação cruzada dos lotes subsequentes (ROTHROCK et al., 2015).

A próxima operação é adjacente à escalda e refere-se à retirada das penas. Essa etapa é realizada através de cilindros rotativos com dedos de borracha, que são esfregados em diferentes regiões das carcaças para a remoção das penas. Deve ser mecanizada com as aves penduradas pelos pés e processadas logo após a escalda. Em seguida, uma nova etapa de retirada das penas é realizada de forma manual, para remoção total das penas (BRAR et al., 2021).

Em seguida, as aves passam pela etapa de evisceração, que inclui processos com o objetivo da separação das vísceras. É realizado o corte da cloaca e a abertura do abdome, as vísceras são expostas, examinadas e separadas. Normalmente a retirada das vísceras segue a ordem: traqueia, cloaca, vísceras não comestíveis, vísceras comestíveis e pulmões (BRAR et al., 2021). Essa etapa normalmente é apontada como ponto crítico do processamento, devido à microbiota presente em altas contagens no trato digestivo. Isso porque o trato gastrointestinal das aves hospeda muitas bactérias, incluindo bactérias patogênicas (HUE et al., 2011).

A etapa de resfriamento das carcaças é estabelecida pela Portaria 210/98 – MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e deve ser realizada logo após a evisceração das carcaças. As aves são imergidas em tanques de resfriamento, denominados na indústria como *chillers*, onde as carcaças são resfriadas. Em algumas indústrias, encontra-se dois tanques, sendo o primeiro para um pré-resfriamento e o segundo para o resfriamento propriamente dito, para que as carcaças atinjam a temperatura exigida pela legislação. No pré-resfriamento as carcaças são imersas em tanque com água, saindo dele com temperatura inferior a 16°C. Na saída do tanque de resfriamento, as carcaças devem ter temperatura entre 0 e 4°C no centro do peito, medida com um termômetro do tipo “espeto” (BRASIL, 1998). O resfriamento adequado preserva a qualidade da carne e garante sua inocuidade (CARCIOFI; LAURINDO, 2010). Por isso, as condições de refrigeração são muito importantes e uma interrupção da cadeia de refrigeração pode acelerar o crescimento microbiano (BOLDER, 2007).

A etapa de gotejamento é realizada logo após e têm como objetivo o escoamento da água absorvida na operação de resfriamento, onde a absorção de água pelas carcaças não deverá ultrapassar 8% da sua massa. A depender do produto, as carcaças podem ser submetidas a diferentes classificações, como linha de frango inteiro, de desossa convencional para cortes com

ossos ou filés, ou desossa mecânica para a obtenção de pescoço, ossos e dorso, seguido da embalagem e congelamento (BRASIL, 1998).

A potencial existência de patógenos nas carcaças pode ser diferente em cada etapa e sua prevalência depende das particularidades das plantas de processamento e dos animais recebidos. No entanto, as etapas de evisceração, lavagem e resfriamento são particularmente susceptíveis à contaminação microbiana (GUERIN et al., 2010; PARK et al., 2015; SCHMIDT et al., 2012).

As indústrias que abatem e processam aves devem organizar suas linhas de produção de modo a evitar a presença de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. A produção de animais vivos livres de patógenos é fundamental, facilitando que os abatedouros mantenham a linha de processamento com baixa presença ou livre desses microrganismos (VOIDAROU et al., 2011).

Dentre os microrganismos patogênicos que podem ser encontrados em aves e abatedouros de aves, a *Salmonella* é prevalente (PARRY-HANSON KUNADU; OTWEY; MOSI, 2020). Ainda que as aves não sejam consumidas cruas, elas podem abrigar *Salmonella*, favorecendo a contaminação cruzada na indústria (DAVE; GHALY, 2011; ZHU et al., 2017) e nas casas dos consumidores. Dependendo da carga inicial, do tipo de preparo do alimento, a *Salmonella* pode causar infecções alimentares (THUNG et al., 2016).

O controle da contaminação microbiana durante o abate e processamento baseiam-se na aplicação de processos sanitários e higiênicos. As escolhas das técnicas empregadas durante o processamento devem ser executadas com a finalidade de minimizar a carga microbiana no produto. No entanto, mesmo quando as melhores práticas higiênicas de abatedouro são aplicadas, a prevenção completa de toda a contaminação microbiana das carcaças é inatingível sob condições comerciais. Portanto, é necessário reduzir ainda mais as cargas microbianas nas carcaças por meio de intervenções adicionais, ou seja, tratamentos de descontaminação (BUNCIC; SOFOS, 2012).

Os principais desafios relacionados a patógenos microbianos incluem as medidas adequadas que evitem surtos de doenças transmitidas por alimentos, os *recalls* de produtos associados, e a garantia dos processamentos em conformidade com a legislação. Outra dimensão do problema está relacionada à contaminação cruzada de alimentos que não sejam produtos de carne, como água, equipamentos, ar e manipuladores (SOFOS; GEORNARAS, 2010).

Sendo assim, a relação entre a percepção de qualidade do consumidor e o impulso da indústria de alimentos para satisfazer as necessidades do consumidor é complexa e envolve muitas dimensões. A ciência e a inovação desempenham um papel importante na produção de conhecimento que auxiliem a indústria a responder às preocupações e expectativas dos consumidores (TROY; KERRY, 2010).

## 2.2 *Salmonella*

### 2.2.1 Características da *Salmonella*

A *Salmonella* foi descoberta e isolada de porcos em 1855 por Theobald Smith, e recebeu o nome do Dr. Daniel Elmer Salmon, patologista que trabalhava com Smith. Existem mais de 2500 sorotipos identificados, e de acordo com a nomenclatura, pertencem à família das Enterobacteriaceae. O gênero está constituído de duas espécies geneticamente distintas: *S. enterica* e *S. bongori*. A *S. enterica*, de maior relevância para a saúde pública, sendo composta por seis subespécies, com as denominações *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (SAÚDE, 2011).

As *Salmonellas* possuem forma de bastonete, são gram negativas, não produtoras de esporos, sendo que a maioria das espécies possui flagelos (POPOFF, 2003). São anaeróbias facultativas, se adaptam em uma ampla faixa de temperaturas (5 a 47 °C), toleram grandes variações de pH (4,0 a 9,0) e uma elevada concentração salina (9% NaCl) (L.; SORVILLO; KUO, 2012).

Em comparação com outros sorovares, a *Salmonella* entérica subsp. Entérica sorovar Typhimurium pode causar doenças em uma diversidade de hospedeiros, sendo a principal fonte de salmonelose de origem alimentar (DAR et al., 2017). Estando entre os cinco principais sorotipos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's), estima-se que 16,8% dos surtos de salmonelose estejam ligados à carne de frango (BOORE et al., 2015; IFSAC, 2021). A Instrução Normativa 60/2019 da ANVISA não permite a presença de *S. Enteritidis* e *S. Thyphimurium* em carne de frango e seus derivados em 25 g de produto (BRASIL, 2019).

### 2.2.2 Salmonelose

A salmonelose é uma doença causada pela infecção por *Salmonella*, sendo categorizada como uma importante zoonose em saúde pública, podendo ocorrer de forma direta ou indireta, por meio do contato com animais. Sua gravidade está relacionada com vários fatores, como o grau de imunidade do hospedeiro, presença de coinfeções, estresse, fatores de manejo e dose infectante (WIBISONO et al., 2020). A infecção por *Salmonella* é considerada uma doença mundialmente perigosa, sendo que os principais sorovares relacionados a ela são Typhimurium, Heidelberg e Newport (JAJERE, 2019). *Salmonella* Typhimurium é o sorotipo mais relacionado à contaminação de aves e à incidência de Salmonelose em humanos. Além disso, a *Salmonella* Typhimurium possui mecanismos de defesa para resistir a ambientes extremos (como o pH ácido do estômago) e múltiplos fatores de virulência que causam inflamação no intestino, febre e diarreia. Tendo em vista o exposto, é imprescindível encontrar uma maneira de reduzir a carga ou eliminar a presença de *Salmonella* Typhimurium na carne de frango (GART et al., 2016; LÓPEZ-ROMERO et al., 2018).

De acordo com o CDC, para a maioria das pessoas, a salmonelose causa diarreia, febre e cólicas estomacais. Os sintomas geralmente começam de 6 horas a 6 dias após a infecção e podem durar de 4 a 7 dias. O tratamento é mais intensivo para pessoas com doenças graves ou debilitadas e, em alguns casos, requer hospitalização (CDC, 2022). A Salmonelose pode ser disseminada através do consumo de vários alimentos contaminados por *Salmonella*, como frutas e vegetais, mas têm sido mais atribuídas e vinculadas a produtos de origem animal, como porcos, ovos e frangos (ANDERSON et al., 2016; PUI et al., 2011).

Os surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a *Salmonella* têm ganhado destaque e atenção dos órgãos governamentais, pois esse microrganismo está vinculado a surtos recentes em diversos alimentos. Os surtos de salmonelose associados a frangos também têm ocorrido. Em 2018, nos Estados Unidos houve um surto de salmonelose devido ao consumo de salada com frango, resultando em 265 casos registrados, com 94 hospitalizações e 1 morte (CDC, 2018). Em 2019, o CDC e várias autoridades de Nova York investigaram um surto de salmonelose ligado a frango cru, com relato de 129 casos, 25 hospitalizações e 1 morte (CDC, 2019). Outro surto foi relatado em 2021, em aves de quintal, resultando em 1.135 pessoas doentes, 273 internações e 2 mortes (CDC, 2021). A identificação de *Salmonella* nos produtos

acabados é grave e pode ameaçar a avicultura e a saúde pública, além de resultar em perdas econômicas (TAUXE et al., 2010).

### 2.3 Alternativas para a inativação de microrganismos em alimentos

A indústria deve fornecer alimentos seguros para o consumo e de qualidade para os consumidores, usando processos adequados para cada tipo de produto e estratégias para controlar patógenos e microrganismos deteriorantes. O método de inativação microbiano mais aplicado nas indústrias de alimentos é o tratamento térmico, enquanto as reduções da temperatura e da atividade de água, bem como a adição de conservantes são usados para reduzir as velocidades de crescimento microbiano e das reações químicas e bioquímicas indesejáveis (PISOSCHI et al., 2018).

Os tratamentos térmicos de alimentos resultam na pasteurização ou esterilização de alimentos. Além da inativação de microrganismos deteriorantes e patógenos, a aplicação do calor resulta no desenvolvimento de sabores, aromas, textura e cor, típicos de um alimento cozido (SILVA; GIBBS, 2012). Em alguns casos, o tratamento térmico afeta negativamente as características físico-químicas, o valor nutricional e propriedades sensoriais dos alimentos. Além disso, em algumas empresas, a energia usada nos tratamentos térmicos resulta da queima de combustíveis fósseis, que emitem gás carbônico na atmosfera. Os custos desses combustíveis também devem ser considerados, pois fazem parte do custo de produção. Novas tecnologias, chamadas de “não térmicas”, capazes de realizar inativação microbiana, têm surgido como alternativas ao tratamento térmico. Essas tecnologias têm sido indicadas para atender às exigências e expectativas dos consumidores por alimentos nutritivos e próximos das suas características originais (AGREGÁN et al., 2021; PUÉRTOLASA et al., 2013)(BARBA et al., 2017).

Para reduzir a presença de microrganismos patogênicos e deteriorantes, e garantir a segurança microbiológica e a qualidade da carne fresca, a indústria processadora de aves tem usado tratamentos físicos, químicos e biológicos nas diversas etapas do processo. (LORETZ; STEPHAN; ZWEIFEL, 2010; ZHUANG et al., 2019). Segundo (GAMBLE et al., 2016), vários produtos químicos antimicrobianos são atualmente utilizados como auxiliares de processamento, com o objetivo de reduzir bactérias patogênicas em carcaças de aves

processadas. No entanto, os compostos antimicrobianos são menos eficientes quando as células bacterianas aderem às superfícies dos alimentos (DJEJBI-SIMMONS et al., 2019).

Durante o processamento não térmico, mantém-se a temperatura do alimento abaixo de acordo com os tratamentos térmicos, o que evita a variação de temperatura no alimento. Uma tecnologia não térmica significa, para um processador de alimentos, que o processo que produz a inativação de patógenos não depende da morte térmica, sendo assim, os procedimentos não térmicos de processamento de alimentos têm um impacto prejudicial mínimo nos alimentos, onde as vitaminas, os nutrientes essenciais e os sabores sofrem alterações mínimas ou inexistentes (BARBHUIYA; SINGHA; SINGH, 2021; TROY et al., 2016).

Há vários tratamentos não térmicos aplicados em alimentos minimamente processados e produtos à base de carne e de peixe. Os processos físicos, como a alta pressão hidrostática, ultrassom, plasma frio e luz pulsada são capazes de inativar microrganismos em temperatura ambiente (FERNÁNDEZ; THOMPSON, 2012; KRAMER; WUNDERLICH; MURANYI, 2017). No que se refere ao controle de patógenos e microrganismos deteriorantes em alimentos, vários estudos relatam a utilização de processos não térmicos para diferentes produtos alimentícios. A alta pressão hidrostática (HHP) (AGREGÁN et al., 2021; CAP et al., 2020; OEY et al., 2008), ultrassom (PIYASENA; MOHAREB; MCKELLAR, 2003; ZINOVIADOU et al., 2015), plasma frio (COUTINHO et al., 2018; FERNÁNDEZ; NORIEGA; THOMPSON, 2013; YADAV; ROOPESH, 2022) e luz pulsada (AGUILÓ-AGUAYO et al., 2013; AVALOS LLANO et al., 2016; HUANG et al., 2017) têm ganhado atenção pelos pesquisadores nos últimos anos.

Cada uma dessas tecnologias possui mecanismos de funcionamento e de inativação microbiana diferentes. Conhecer as particularidades, as limitações e os impactos na qualidade e inocuidade dos alimentos tratados é de extrema importância para que haja aplicações práticas bem sucedidas (BARBA et al., 2017).

#### 2.4 Luz pulsada de alta energia (LP)

A luz pulsada de alta energia (LP) é uma tecnologia não térmica que tem sido estudada como alternativa aos métodos tradicionais (térmicos e químicos) de desinfecção e preservação de alimentos. É um método de processamento emergente, rápido, que não gera resíduos nas superfícies dos alimentos tratados. Os pulsos de luz de alta energia são ultracurtos

(microssegundos ou milissegundos), produzidos por descargas controladas de um capacitor com alta tensão elétrica. Os pulsos elétricos são entregues para lâmpadas de gás inerte, que emitem flashes de amplo espectro de frequência, entre 200 e 1100 nm (CHEN et al., 2015; MAHENDRAN et al., 2019).

Essa faixa de comprimento de onda inclui a luz ultravioleta (UV): 200 a 400 nm, subdividida em (UV-A): 320 a 400 nm, (UV-B): 290 a 320 nm e (UV-C): 200 a 290 nm, luz visível (LV): 400 a 700 nm e luz com comprimentos de onda na banda do infravermelho (IR): 700 a 1100 nm (KRAMER; MURANYI, 2014).

A ação da LP decorre da coexistência de diferentes mecanismos de inativação. A inativação microbiana acontece devido aos danos causados no DNA dos microrganismos, por efeitos fotoquímicos, fototérmicos e fotofísicos.

Os efeitos fotoquímicos referem-se principalmente a alterações químicas nas moléculas de DNA. Em particular, o componente UV-C da LP pode ser absorvido pelo DNA e outros componentes da célula, causando danos fotoquímicos, que inativam as células microbianas e impedem a replicação celular (GÓMEZ-LÓPEZ et al., 2007; INNOCENTE et al., 2014; WANG et al., 2005). A conversão fotoquímica de bases de pirimidina no DNA bacteriano causa a formação de dímeros de timina, que impedem que o DNA seja descompactado para replicação, tornando o microrganismo incapaz de se reproduzir (ELMNASSER et al., 2007).

O efeito fototérmico ocorre devido ao aquecimento local das bactérias pela radiação emitida pela LP, enquanto os efeitos fotofísicos referem-se ao dano estrutural na membrana das bactérias causado por distúrbios induzidos pela LP (KRISHNAMURTHY et al., 2010; LI; FARID, 2016).

Os principais parâmetros de operação de um equipamento de LP são: i) a duração do pulso, que é o intervalo de tempo (ns a ms) durante o qual a energia luminosa é emitida ii) o número de pulsos ou flashes entregue ao substrato alvo, iii) a fluência (F), que é a energia radiante total emitida em todas as direções, expressa em  $J/cm^2$  (GÓMEZ-LÓPEZ; BOLTON, 2016).

Os principais parâmetros operacionais que afetam a eficácia do tratamento por LP são o número de pulsos, a voltagem aplicada, a distância entre a amostra e a lâmpada e o tempo entre a contaminação e o tratamento (CHEIGH; HWANG; CHUNG, 2013; KOCH; WIACEK; BRAUN, 2019). O microrganismo alvo e a rugosidade (irregularidades) da superfície do

substrato (superfície do alimento) e o efeito de sombreamento causado nos microrganismos são fatores importantes que podem influenciar a efetividade do processo (AGÜERO et al., 2016; CHEN et al., 2015; MAFTEI et al., 2014).

Além das características estruturais da superfície, sua opacidade e a composição de nutrientes também são fatores importantes a serem considerados, que podem proteger os microrganismos contra a ação letal da LP (KOCH; WIACEK; BRAUN, 2019). A hidrofobicidade da superfície do alimento também é importante, pois afeta a distribuição das células microbianas, promovendo a formação de aglomerados celulares, reduzindo a inativação pela LP (RINGUS; MORARU, 2013).

A utilização da LP no processamento de alimentos foi aprovada nos EUA em 1996, pela Food and Drug Administration (FDA). A agência determinou alguns limites para que o alimento seja seguro para consumo. A fluência de luz durante o tratamento não deve exceder  $12 \text{ J/cm}^2$ , sendo que o espectro de emissão de luz deve permanecer na faixa de 200 a 1100 nm, duração do pulso menor ou igual a 2 s. No entanto, apesar das aprovações e do crescimento significativo das pesquisas sobre LP, ainda existe lacunas a serem respondidas (SCHOTTROFF et al., 2018).

Em relação às aplicações da LP no processamento de alimentos, vários estudos relataram seu uso na inativação de diferentes microrganismos, como *Listeria* (FERNÁNDEZ et al., 2016; HIERRO et al., 2009), *E. Coli* (PREETHA et al., 2021; VALDIVIA-NÁJAR et al., 2017), *Bacillus* (HWANG; KIM; CHUNG, 2021; NICORESCU et al., 2013) e *Salmonella* (KEKLIK; DEMIRCI; PURI, 2010; LIU et al., 2021; MENGARDA BUOSI et al., 2022). Há trabalhos publicados sobre o uso da LP em diversos alimentos sólidos e líquidos, que incluem frutas e hortaliças (CHARLES et al., 2013; IZQUIER; GÓMEZ-LÓPEZ, 2011), carnes (BAPTISTA et al., 2022; KRAMER; WUNDERLICH; MURANYI, 2019; SÖBELI; UYARCAN; KAYAARDI, 2021), sucos (BHAGAT; CHAKRABORTY, 2022; ZHU et al., 2019), queijos (RICCIARDI et al., 2021) e frutos do mar (LASAGABASTER; MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, 2017; OZER; DEMIRCI, 2006).

Comparado a outros métodos de esterilização e a outras técnicas não térmicas, a LP fornece muitas vantagens, como pequenas mudanças de temperatura do alimento, com danos mínimos aos produtos, curta duração de aplicação e eficiência operacional, sendo livre de resíduos químicos (CHEN et al., 2015; TURTOI; NICOLAU, 2007). O tratamento com luz pulsada pode ser utilizado com várias finalidades dentro da indústria de alimentos, sendo que

sua eficácia depende dos parâmetros de aplicação, das características do produto tratado e do microrganismo alvo (ABIDA; RAYEES; MASOODI, 2014).

Sua aplicação em produtos cárneos pode proporcionar uma redução de 1 a 3 logs na carga microbiana de patógenos contaminando a superfície dos alimentos, sendo ainda capaz de prolongar a vida de prateleira destes produtos (MAHENDRAN et al., 2019). A tecnologia de luz pulsada mostra-se eficaz para inativar diversas espécies de microrganismos, inclusive as que possuem resistência ao calor. Contudo, essa descontaminação deve considerar as possíveis interações entre a superfície alvo e o microrganismo avaliado (LEVY et al., 2012).

O desenvolvimento de uma nova tecnologia de intervenção para descontaminar produtos de frango contaminados com *Salmonella* durante a fabricação é necessário. Para isto, esta intervenção deve ser rápida, para acompanhar a dinâmica de uma linha de produção avícola (GAO; MATTHEWS, 2020; ROH et al., 2020). Uma tecnologia eficiente deve ser capaz de inativar o microrganismo alvo, pois só assim encontrará aplicações práticas nas indústrias alimentícias. Além disso, a escolha de uma tecnologia deve ponderar o custo de instalação, o consumo de energia, o impacto ambiental, o efeito nas propriedades dos alimentos, e sua adequação em uma linha de processamento com os seus equipamentos (BARBA et al., 2017; MORALES-DE LA PEÑA; WELTI-CHANES; MARTÍN-BELLOSO, 2019).

Mesmo sendo promissora, a aplicação da LP em alimentos necessita de estudos mais sistemáticos e precisos sobre o efeito dos parâmetros mais relevantes que afetam a eficiência do processo LP, que deve incluir também a padronização das doses de tratamento. O projeto de sistemas LP deve ser otimizado para cada aplicação, para melhorar a homogeneidade do tratamento e, assim, aumentar os efeitos microbicidas dessa tecnologia (VARGAS-RAMELLA et al., 2021).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

A cepa de *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) utilizada neste estudo foi adquirida da American Type Culture Collection. A cepa foi armazenada a -24 °C em tubo Eppendorf contendo solução de glicerol a 30% (v/v).

Peitos de frango congelados, desossados e sem pele (BRF.SA, Toledo, Paraná, Brasil), foram obtidos em mercado local na cidade de Florianópolis – SC e foram encaminhados ao Laboratório de Engenharia Biológica (LIEB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e armazenados à temperatura de -18 °C até a realização dos experimentos.

### 3.2 Dispositivo de LP

A tecnologia de luz pulsada Xenon (X-1100, Xenon Corporation, Wilmington, MA, USA) foi utilizada neste estudo. O dispositivo X-1100 é composto por um painel de controle (3), um exaustor (2) e uma câmara de tratamento (1), conforme apresentado na Figura 2. A câmara de aço inoxidável tem uma bandeja móvel em seu interior, que pode ser ajustada em onze distâncias (alturas) diferentes entre a amostra e a lâmpada linear, permitindo ao usuário a escolha mais apropriada, em função do tratamento desejado. Quanto mais próxima a amostra estiver da lâmpada, maior a intensidade do tratamento.

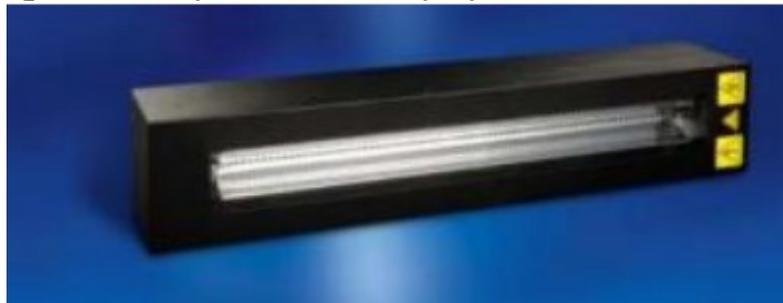
Figura 2- Equipamento de luz pulsada da Xenon, modelo X-1100. A fotografia da parte superior é uma visão geral do equipamento. Na parte inferior são mostradas: Câmara de tratamento (1), Exaustor (2) e Painel de controle (3).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A Figura 3, mostra a lâmpada que fica alocada na parte superior da câmara de tratamento, a carcaça da lâmpada modelo LH-840, possui uma área de curva de 406 x 25,4 mm (16 x 1 polegada) e uma distância de 25,4 mm (1 polegada) da janela de carcaça da lâmpada. Uma lâmpada de flash linear e um refletor são montados dentro da carcaça com provisões para resfriamento de ar externo.

Figura 3 – Lâmpada LH-840 do equipamento Xenon X-1100.



Fonte: Xenon Corp, 2023

### 3.3 Mapeamento da fluência no equipamento de luz pulsada

Segundo Gómez-Lópes et al. (2005), a lâmpada não tem emissão igual em todas direções. Além disso, a luz emitida sofre múltiplas reflexões no interior da câmara de tratamento, que depende das dimensões e posição da amostra em tratamento, causando mudanças na energia absorvida pela amostra. Por isso, para compreender detalhes do tratamento por LP, o mapeamento da energia que chega na superfície do material, em função de sua posição no interior da câmara de tratamento é crucial.

Para o mapeamento da radiação incidente em diferentes posições no interior da câmara de tratamento, utilizou-se um radiômetro (OPHIR, NOVA II). Foram estudados os seguintes parâmetros operacionais do equipamento de LP: i) voltagem, ii) duração do pulso de luz, iii) distancias horizontais e verticais em relação à lâmpada. A Figura 4 ilustra com fotos o radiômetro usado, assim uma das posições estudadas no interior da câmara

Figura 4 - Radiômetro utilizado para medir as fluências em função dos parâmetros de operação e da posição da amostra no interior da câmara de tratamento.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Um planejamento fatorial  $3^2$  foi realizado para entender os efeitos dos parâmetros de operação da posição relativa no interior da câmara sobre a fluência. Os fatores escolhidos foram a voltagem de entrada (V) e a largura do pulso ( $\mu\text{s}$ ), em três níveis, -1; 0 e +1. As variáveis reais e variáveis codificadas foram geradas pelo *software* Statística 7.0, assim como as combinações de experimentos e os valores dos parâmetros de operação, que estão apresentadas na Tabela 1. Os experimentos foram realizados para todos os níveis e posições mencionadas.

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se um pulso de luz e cada medida foi realizada em triplicata, em todos os níveis e posições, para cálculo das médias entre os valores obtidos.

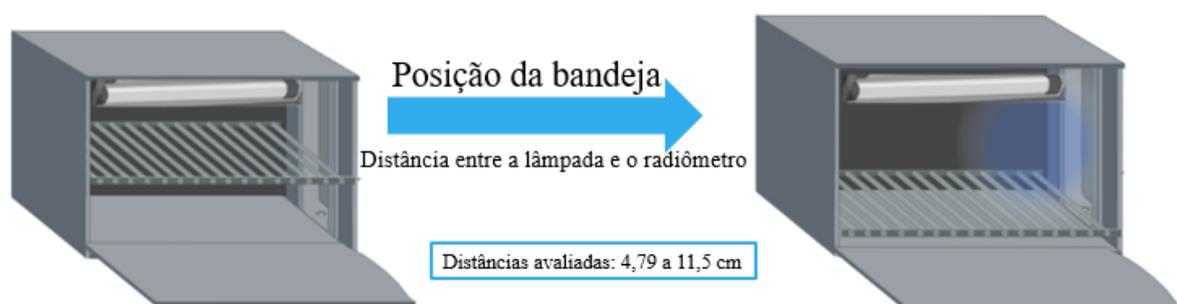
Tabela 1 – Domínio experimental com variáveis utilizadas no planejamento.

Ordem	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	Voltagem	Largura do pulso	Voltagem (V)	Largura do pulso ( $\mu\text{s}$ )
1	-1	-1	2000	210
2	-1	0	2000	420
3	-1	1	2000	630
4	0	-1	2500	210
5	0	0	2500	420
6	0	1	2500	630
7	1	-1	3000	210
8	1	0	3000	420
9	1	1	3000	630

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na Figura 5 é representada a câmara de LP, que conta com uma bandeja móvel, que permite mudar suas distâncias verticais com relação à lâmpada. O equipamento conta com 11 distâncias ajustáveis da bandeja, resultando em 11 distâncias verticais diferentes entre a bandeja e a lâmpada. Neste estudo, as distâncias são chamadas de níveis. Sendo o nível 1 o mais próximo da lâmpada e o nível 11 o mais distante. Para o mapeamento foram utilizados os níveis de 5 a 11, equivalentes às distâncias de 4,79 a 11,5 cm, respectivamente. Os níveis de 1 a 4 não foram utilizados, pois a altura do radiômetro excedia a distância entre a bandeja e a lâmpada.

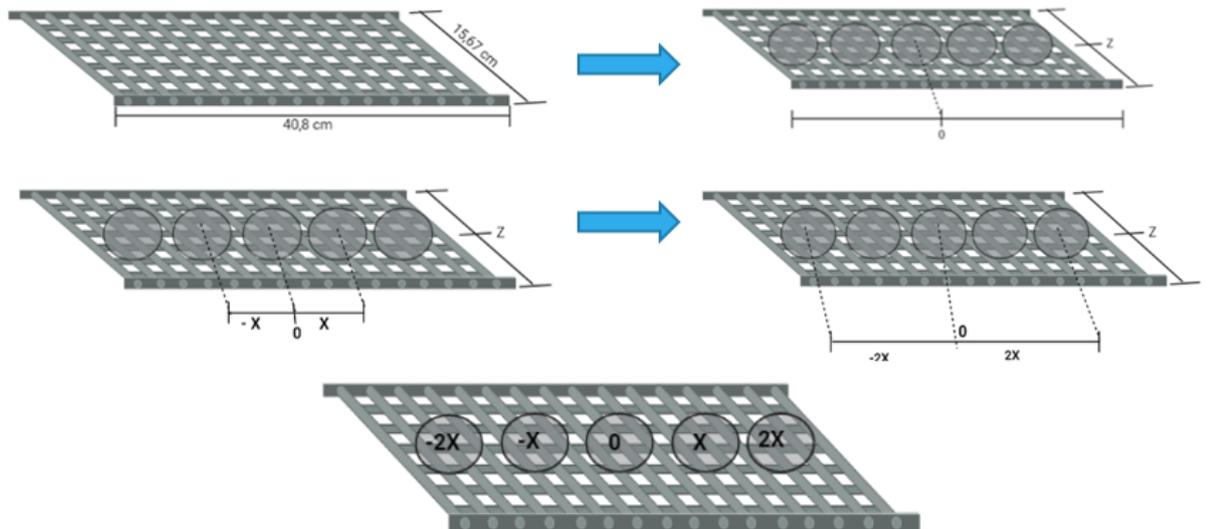
Figura 5 – Câmara de tratamento por LP, com a bandeja em diferentes níveis.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

De acordo com as medidas da bandeja, foram determinadas cinco posições horizontais em que o sensor seria alocado. As posições, as denominações e suas respectivas distâncias estão apresentadas na Figura 6.

Figura 6 – Posições horizontais do radiômetro.

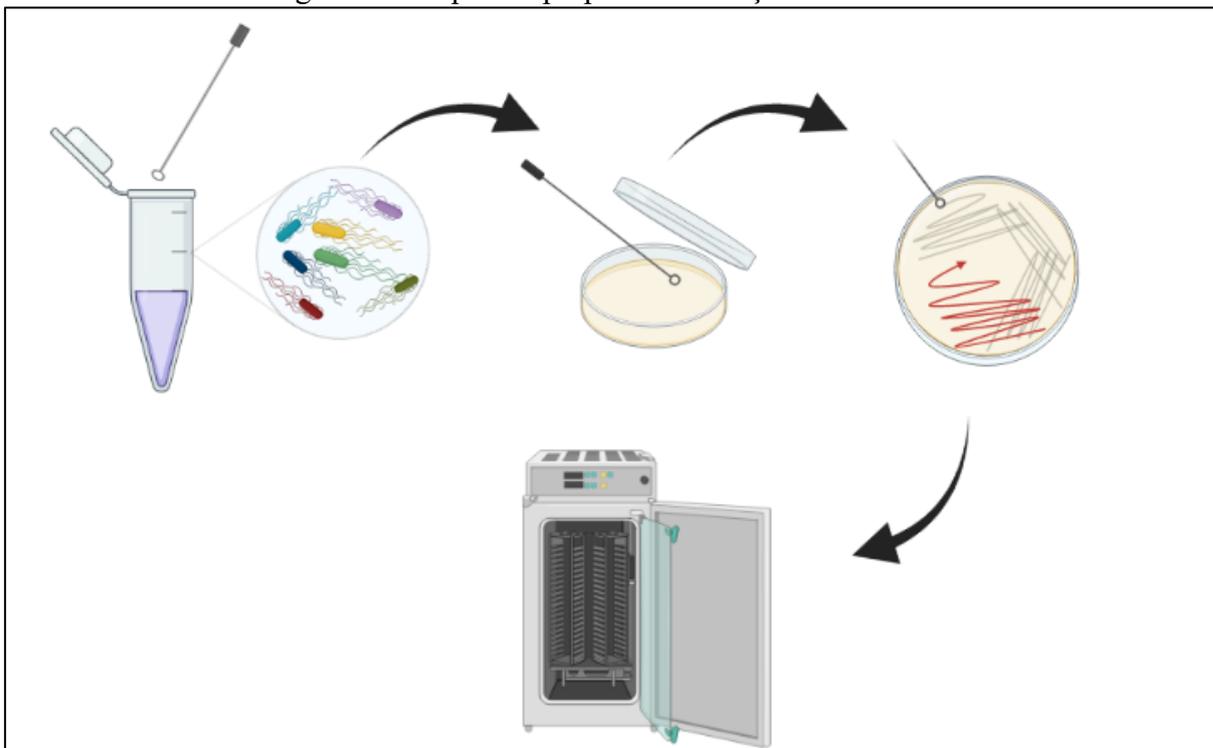


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.4 Preparo do inóculo

O processo do preparo da cultura bacteriana foi realizado seguindo a metodologia de Buosi et al. (2022). Para a ativação da bactéria, 1 alçada microbiológica da suspensão da cultura estoque armazenada foi inoculada em placa com meio Tryptic Soy Agar (TSA) e incubado com as placas invertidas em uma BOD (Dist) a 37 °C, por 24 h, para obtenção de colônias únicas, conforme apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Etapas do preparo da ativação da bactéria.

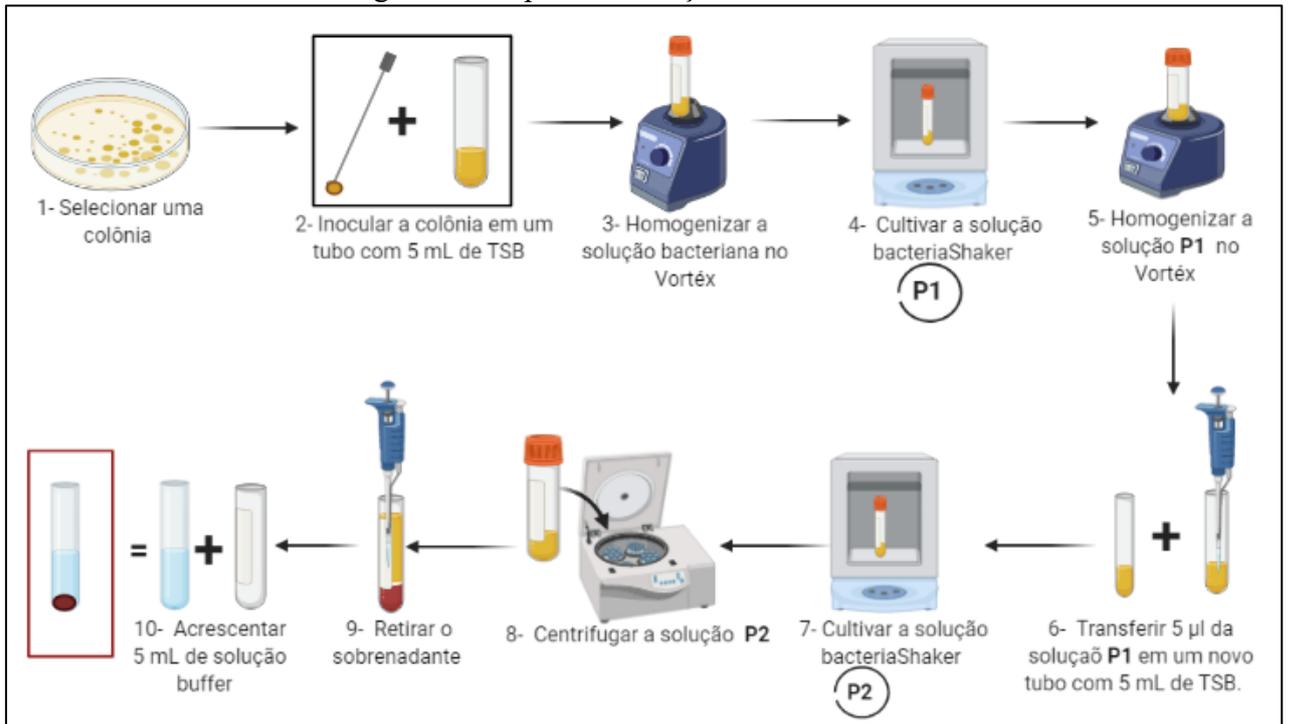


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O preparo da cultura bacteriana ocorreu utilizando o método mostrado na Figura 8. Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foi escolhida uma colônia, que foi inoculada em tubo contendo 5 mL de caldo Tryptic Soy Broth (TSB), posteriormente incubado com agitação por 24 h a 37 °C e 210 rpm em uma incubadora (Tecnal, TE-4200). Posteriormente, 5 µL da solução bacteriana foram transferidos em um novo tubo com 5 mL de TSB e cultivado, mantendo agitação por 16 h a 37 °C. Após, o tubo contendo a suspensão de cultura bacteriana foi centrifugado (Centribio) a 3800 rpm por 7 min.

Após descarte do sobrenadante, no tubo contendo o precipitado foram adicionados 5 mL de solução tampão fosfato (BPB) pH 6, seguido da homogeneização com vórtex (Kasvi, K45-2820). A concentração da cultura bacteriana obtida foi da ordem de  $10^9$  UFC/mL, identificado através de testes de recuperação. Hsu e Moraru (2011) analisaram o efeito de diferentes substratos na absorção de luz pulsada e observaram que o tampão fosfato (BPB) absorveu menos luz UV do que TSB e suco de maçã. A diferença na absorção está relacionada à composição química.

Figura 8 - Preparo da solução bacteriana.

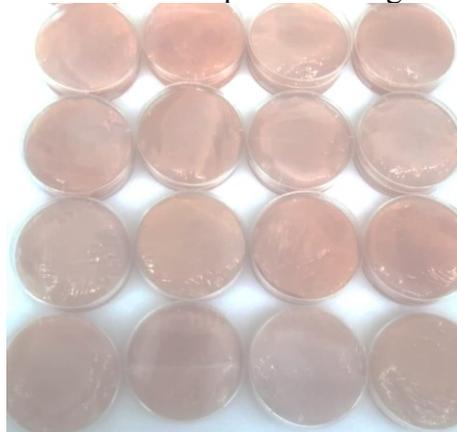


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.5 Preparo da amostra

Os cortes de peito de frango foram realizados seguindo a metodologia de Buosi et al. (2022), onde foram descongelados em um refrigerador a 12 °C por 24 h antes das análises. As amostras foram cortadas com o auxílio de uma faca nas dimensões de 60 x 15 mm e armazenadas sob refrigeração em placas de Petri fechadas. As amostras foram cortadas e colocadas nas placas de Petri conforme descrito e estão apresentadas na Figura 9.

Figura 9 – Amostras de filé de peito de frango cortadas.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Foram realizados quatro diferentes estudos variando: a) a concentração do inóculo inicial; b) O tempo entre inoculação da *Salmonella* no peito de frango até o tratamento por LP; c) O volume da gota de inoculação e d) a presença de uma camada líquida (filme de água) antes da inoculação e tratamento por LP, detalhados a seguir.

Todas as inoculações ocorreram dentro da cabine de segurança biológica (Pachane, modelo Pa440), onde a parte superior do peito de frango foi inoculada espalhando gotas da solução bacteriana com volume pré-definido, utilizando micropipeta volumétrica (Labmate PRO). Para que ocorresse a fixação e a migração das células bacterianas, os peitos de frango inoculados foram armazenados em refrigeração por tempos pré-determinados, quando estudou-se a influência dessa variável.

### 3.6 Tratamento da superfície de frango de peito de frango com LP

As amostras de frango previamente inseridas em placas de Petri e inoculadas conforme apresentado no item 3.5 foram colocadas na prateleira, centralizadas na câmara, com uma distância equivalente a 6,03 cm entre a lâmpada e a amostra. Foram usadas voltagem de 3000 V, duração do pulso de 420  $\mu$ s, variando-se o número de pulsos de luz entre 1 e 3. Nessas condições, as fluências aplicadas variaram entre 1,91 (1 pulso) e 5,63 J/cm<sup>2</sup> (3 pulsos), medidas com o radiômetro (OPHIR, NOVA II).

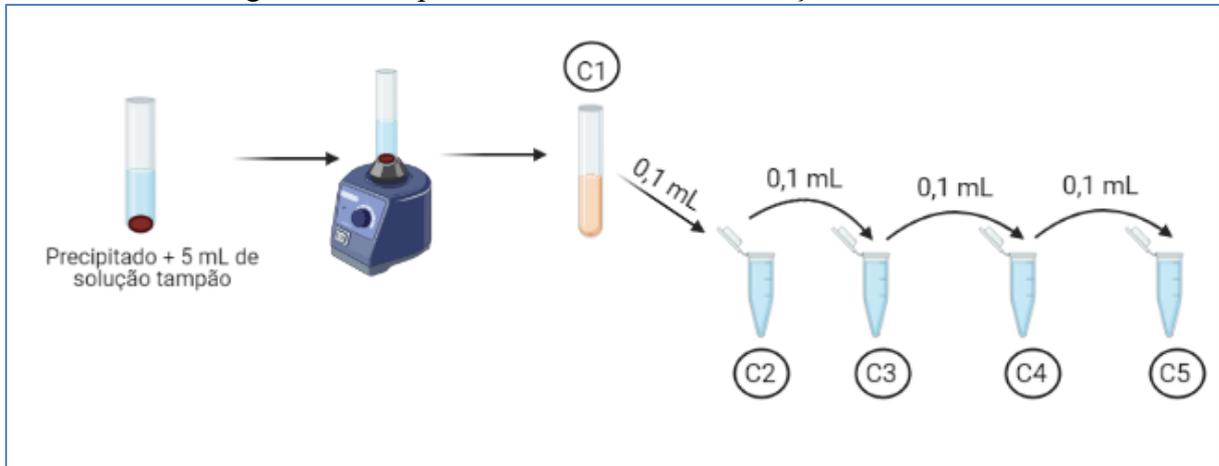
### 3.7 Estudo da concentração do inóculo

Para avaliar possíveis efeitos de sombreamento entre as células de *Salmonella* e a letalidade da LP em diferentes concentrações de *Salmonella* Typhimurium, foram realizados experimentos com diferentes concentrações iniciais. O inóculo utilizado foi preparado seguindo a metodologia descrita no item 3.4.

Conforme apresentado na Figura 10, a cultura bacteriana obtida conforme descrito no item 3.4, foi denominada como C1. A partir desta cultura, foram realizadas diluições em série com a solução tampão BPB, denominadas como C2; C3; C4 e C5. Deste modo, foram avaliadas cinco concentrações iniciais da cultura bacteriana, que variaram de C1 a C5, com concentrações de 10<sup>6</sup> a 10<sup>2</sup> UFC/cm<sup>2</sup> da superfície de peito de frango. Para este estudo, o tempo de contato

entre o inóculo e o peito de frango foi fixado em 15 min, sob refrigeração. As fluências estudadas foram de 1,91 e 5,63 J/cm<sup>2</sup>.

Figura 10 – Preparo das diferentes concentrações de inóculo.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

### 3.8 Estudo do tempo de contato entre *Salmonella* Typhimurium e peito de frango antes do tratamento com LP

Para investigar o efeito protetor da migração da *Salmonella* após a inoculação na superfície dos peitos de frango, quatro tempos diferentes foram usados antes do tratamento com LP. A escolha destes tempos foi baseada no processo produtivo de abates de frango. O inóculo utilizado foi preparado seguindo a metodologia descrita no item 3.4. O preparo da amostra e o procedimento de inoculação foi realizado conforme descrito no item 3.5. Para a inoculação foi utilizada a concentração C1, equivalente a 10<sup>6</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, depositados na superfície de cada amostra de peito de frango. Os tempos de migração avaliados foram 1; 5; 15 e 60 min, denominados como t1; t2; t3 e t4, respectivamente. Foram aplicados 3 pulsos e fluência de 5,63 J/cm<sup>2</sup>.

### 3.9 Estudo do volume de inóculo sobre a superfície do peito de frango

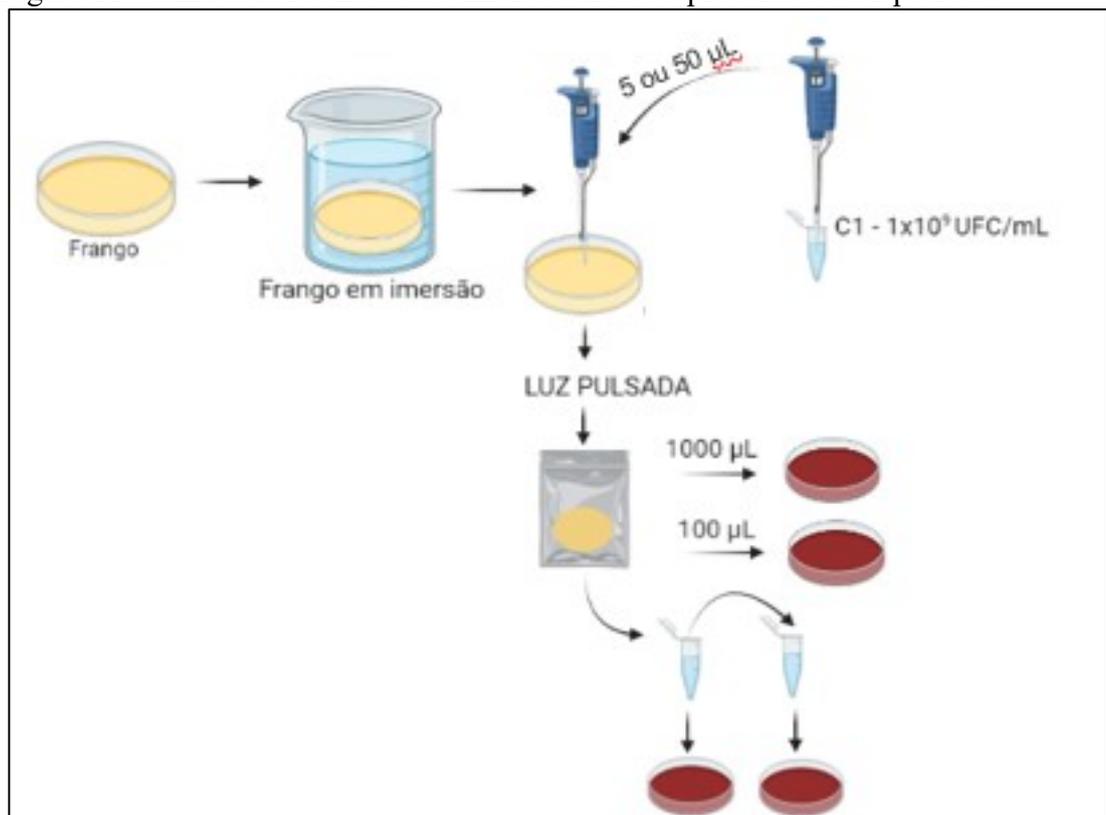
Não se sabe exatamente como se dá a contaminação e aderência da *Salmonella* nas superfícies do peito de frango. Para isso, avaliou-se a influência do volume do inóculo de *Salmonella* Typhimurium sobre o peito de frango na inativação por LP; foram realizados

experimentos com diferentes volumes. O inóculo utilizado foi preparado seguindo a metodologia descrita no item 3.4. O preparo da amostra e o procedimento de inoculação foi realizado conforme descrito no item 3.5. Para a inoculação foi utilizada a concentração C1, equivalente a  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>, e os volumes utilizados foram 5 e 50 µL representando 1 e 10 gotas de inóculo respectivamente, enquanto os tempos de migração utilizados foram de 1; 5 e 15 minutos. Foram aplicados 3 pulsos e fluência de 5,63 J/cm<sup>2</sup>.

### 3.10 Estudo da camada de água na superfície do frango

Para este experimento, foi realizada a etapa de imersão do peito de frango em água antes da inoculação, conforme demonstrado na Figura 11.

Figura 11 – Amostras submetidas a imersão antes do processo de luz pulsada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Foram utilizados volumes de 5 e 50 µL de inóculo, dispersos em 1 ou 10 gotas sobre o frango, com concentrações de  $10^5$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Os tempos de migração utilizados foram 1; 5 e 15 min, denominados como t1; t2 e t3, respectivamente. A

descontaminação da superfície do frango e a enumeração das células bacterianas sobreviventes foram realizadas seguindo as descrições dos itens 3.6 e 3.7 respectivamente. Foram aplicados 3 pulsos e fluência de 5,63 J/cm<sup>2</sup>.

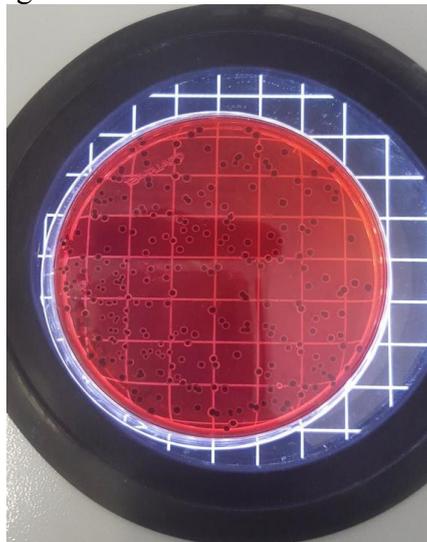
### 3.11 Avaliação do comportamento da gota de inóculo com diferentes condições da superfície da amostra de frango

Durante os experimentos foi possível observar de forma sucinta como a camada de água influencia o espalhamento da gota sobre a superfície do frango. Por isso, para melhor visualização e entendimento, foram realizados experimentos específicos com um corante no inóculo. O inóculo utilizado foi preparado normalmente, seguindo a metodologia descrita no item 3.4 e em seguida adicionado o corante de Safranina. O preparo da amostra e o procedimento de inoculação foi realizado conforme descrito no item 3.5. Para a inoculação foi utilizada a concentração C1, equivalente a 10<sup>6</sup> UFC/cm<sup>2</sup> com volume de 5 µL por gota, que foram aplicadas em superfícies de peito de frango com e sem imersão em água.

### 3.12 Enumeração de células bacterianas sobreviventes

Após o tratamento com LP, cada amostra foi diluída com 30 mL de solução tampão BPB em um saco estéril e homogeneizada por 120 s em um Stomacher (Bag Mister ITR, Servilab). A amostragem foi realizada seguindo o método de enumeração para *Salmonella* descrito na ISO 6579-1 de 04/2021. Em seguida, diluições seriadas foram feitas em eppendorf estéril com 0,9 mL de solução tampão BPB e 0,1 mL da diluição anterior. Posteriormente, foi realizado o plaqueamento em superfície de 0,1 mL de suspensão em placas de Petri descartáveis e estéreis de 90 mm contendo ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). Para o espalhamento utilizou-se alças estéreis de Drigaslki em formato de t. As placas foram invertidas e seguiram para a incubação em BOD a 37 °C durante 24 horas; para cada amostragem foram plaqueadas 3 diluições e todos os plaqueamentos foram realizados em triplicata.

Figura 12 – Contagem das UFC de *Salmonella* em placas de Petri.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

As contagens foram realizadas em UFC, conforme mostrado na Figura 12. Para o cálculo da população bacteriana, as contagens de UFC foram divididas pelo inverso da diluição e pela área do frango cortado. A eficácia de descontaminação do tratamento LP foi representada pelo nível de inativação microbiana determinado pelo  $\text{Log} \left( \frac{N}{N_0} \right)$ , em que  $N$  = População em UFC/cm<sup>2</sup> das amostras tratadas com luz pulsada e  $N_0$  = População inicial em UFC/cm<sup>2</sup> das amostras controle.

As amostras controles eram amostras submetidas a inoculação de acordo com o parâmetro avaliado, mas que não foram submetidas a luz pulsada. Todos os experimentos foram realizados usando a mesma solução bacteriana, no mesmo dia, para cada par de ensaios (tratamento e controle), para minimizar a variabilidade das amostras.

### 3.13 Análise estatística

Os dados experimentais foram tratados com o *software* STATISTICA (versão 7.0). A variância foi analisada usando análise de variância ANOVA. As diferenças significantes entre as amostras foram determinadas pelo teste de Tukey, com nível de confiança de 95 %. Os dados do planejamento experimental e a adequabilidade do modelo foi determinada pela avaliação da probabilidade de F.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Mapeamento da fluência no equipamento de LP

Os experimentos foram projetados para estudar o processo de LP para a inativação de *Salmonella*, e o objetivo desse mapeamento foi entender quais variáveis têm maior impacto no desempenho do processo. Estudou-se como a fluência ( $J/cm^2$ ) varia com a posição, para os parâmetros de processo voltagem (V) e a largura do pulso ( $\mu s$ ). Os resultados são importantes para conhecer as heterogeneidades espaciais do tratamento no interior da câmara, para diferentes voltagens e largura do pulso de luz.

Na Tabela 2 são apresentados os valores de fluência sob diferentes condições do delineamento experimental. Observou-se que a maior fluência foi obtida aplicando-se a maior voltagem e maior largura do pulso. Além disso, vale ressaltar que a posição central (posição 0) é o local onde se observa a maior fluência, seguida das posições próximas ao centro e das extremidades. Sendo assim, quando aplicado em escala industrial, essa variabilidade de energia incidente deve ser levada em consideração, pois um mesmo material em posição diferente em relação à lâmpada receberá uma dose diferente de energia, com consequência direta na inativação dos microrganismos.

Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes aos encontrados por Hsu et al. (2011), que estudaram a distribuição espacial da fluência no ar e em três substratos líquidos diferentes. Eles observaram uma grande variabilidade na distribuição espacial da fluência e enfatizaram que a posição do substrato em relação à lâmpada é um parâmetro que deve ser considerado nas aplicações industriais. Estes autores relataram ainda que a fluência varia significativamente com a distância da lâmpada, em todas as direções, corroborando com o que foi encontrado neste estudo.

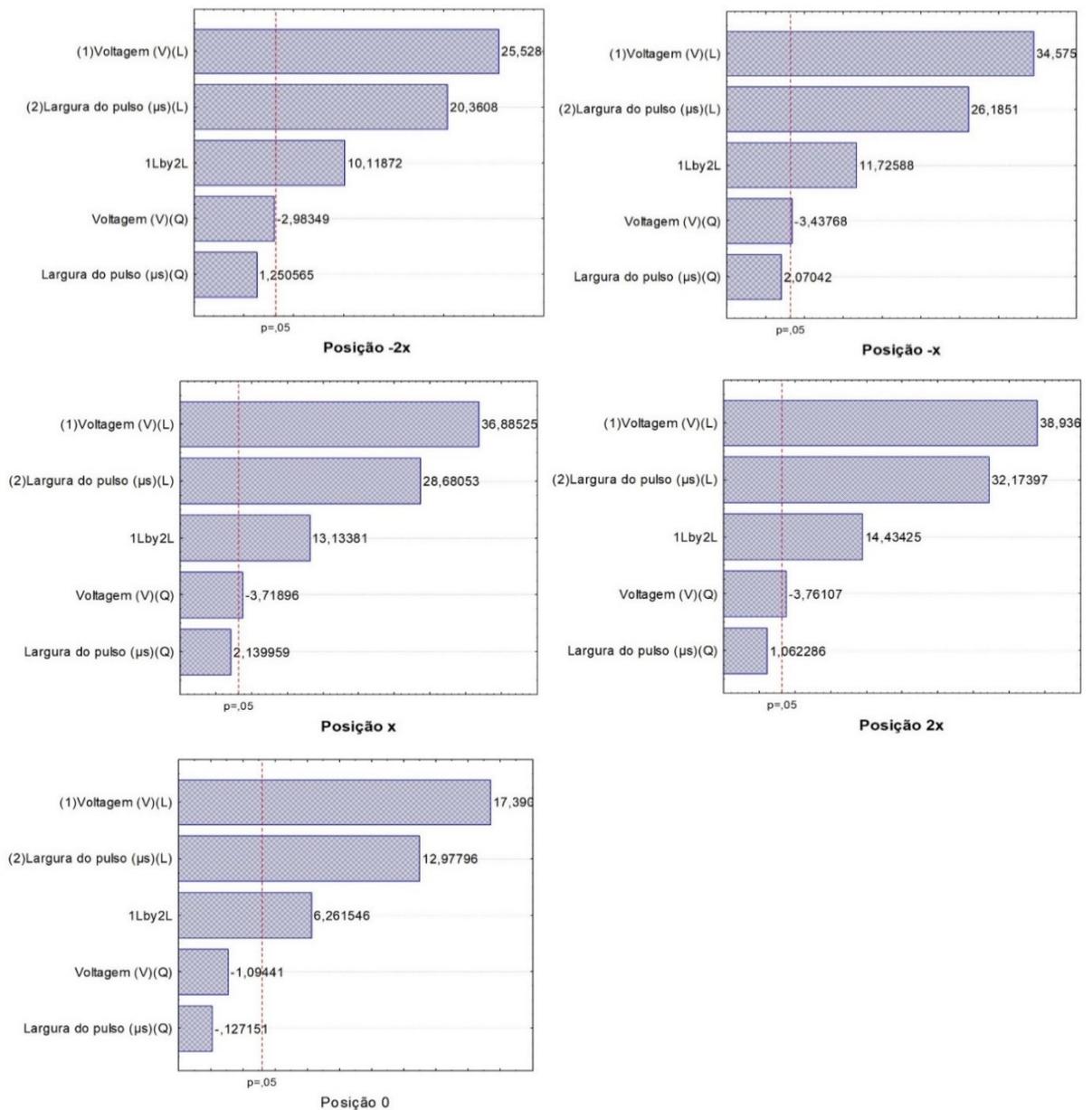
Tabela 2 - Mapeamento na distância 5,15 cm.

Ordem	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Fluências (J/cm <sup>2</sup> )				
	Voltagem	Largura do pulso	Voltagem (V)	Largura do pulso (μs)	-2x	-x	0	x	2x
1	-1	-1	2000	210	0,33	0,34	0,40	0,35	0,31
2	-1	0	2000	420	0,57	0,62	0,64	0,55	0,47
3	-1	1	2000	630	0,72	0,82	0,87	0,85	0,73
4	0	-1	2500	210	0,58	0,65	0,71	0,66	0,56
5	0	0	2500	420	1,01	1,18	1,24	1,20	0,97
6	0	1	2500	630	1,35	1,66	1,76	1,66	1,36
7	1	-1	3000	210	0,89	1,10	1,12	1,09	0,88
8	1	0	3000	420	1,68	2,06	2,14	2,06	1,60
9	1	1	3000	630	2,36	2,72	2,90	2,78	2,24

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O diagrama de Pareto (Figura 13) mostra o comportamento da variável dependente em relação às variáveis independentes. Nota-se que para a fluência, o termo quadrático da duração do pulso foi um parâmetro sem valor significativo ( $p < 0,05$ ) em todas as posições avaliadas. Além disso, pode-se observar que há uma interação entre os parâmetros independentes, fato que sugere que a agregação de ambos os parâmetros é significativa (largura do pulso e voltagem). Essas informações solidificam os achados de Buosi et al. (2022), que relatam que apenas a fluência não descreve adequadamente o tratamento por LP, e que a tensão e a duração do pulso também precisam ser especificadas.

Figura 13 - Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 5,15 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento espacial da fluência na camara de luz pulsada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na Tabela 3 são mostrados os valores de  $F$  e  $p$  para os termos lineares e quadráticos do modelo de interação linear usado no delineamento experimental. Os valores para  $p \leq 0,05$  incluídos na tabela demonstram o que foi discutido anteriormente no gráfico de Pareto. Um

bom ajuste aos dados é mostrado de acordo com o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e indica que a variável resposta é semelhante em todas as posições horizontais avaliadas.

Tabela 3 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 5,15 cm.

Posição	Fatores					
	Voltagem Linear	Voltagem Quadrático a	Largura do pulso Linear	Largura do pulso Quadrático	Voltagem*Largura do pulso Linear	
<b>-2x</b>	F	651,69	8,9012	414,56	1,5639	102,3886
	P	0,0001	0,0584	0,0002	0,2997	0,0020
	R <sup>2</sup>				0,997	
	R <sup>2</sup> adj.				0,993	
<b>-x</b>	F	1195,4	11,818	685,660	4,287	137,496
	P	0,0000	0,0413	0,0001	0,1302	0,0013
	R <sup>2</sup>				0,998	
	R <sup>2</sup> adj.				0,996	
<b>0</b>	F	302,43	1,1977	168,42	0,0162	39,2070
	P	0,0004	0,3538	0,0009	0,9068	0,0082
	R <sup>2</sup>				0,994	
	R <sup>2</sup> adj.				0,984	
<b>x</b>	F	1360,5	13,831	822,573	4,579	172,497
	P	0,0000	0,0338	0,0000	0,1218	0,0009
	R <sup>2</sup>				0,998	
	R <sup>2</sup> adj.				0,996	
<b>2x</b>	F	1516,1	14,146	1035,164	1,128	208,35
	P	0,0004	0,0329	0,0000	0,3660	0,00072
	R <sup>2</sup>				0,999	
	R <sup>2</sup> adj.				0,997	

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

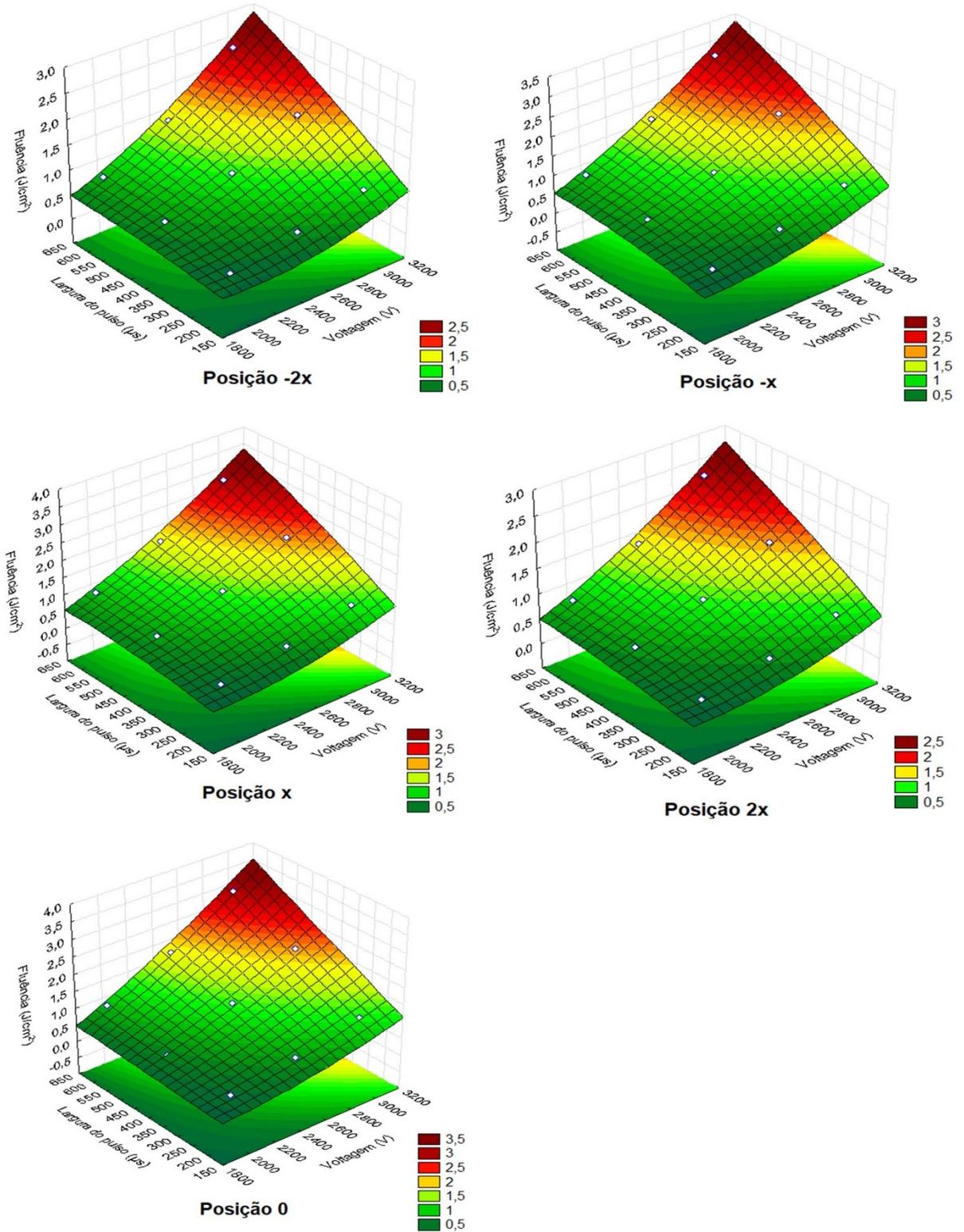
Na Figura 14 são ilustradas as médias dos resultados de fluência para a superfície de resposta. O gráfico de superfície de resposta mostrou que as duas variáveis estudadas (voltagem e largura do pulso) tiveram um efeito positivo na fluência. Como a fluência é um fator diretamente associado com a inativação microbiana, podemos fazer uma análise da situação com base nos resultados observados por Gómez-López et al. (2005). Eles observaram que quando a distância vertical da lâmpada aumenta, a descontaminação das amostras foi menos intensa. Além disso, a inativação é sempre maior no centro (alinhado com a lâmpada) do que nas bordas das prateleiras, para todas as alturas.

O mapeamento de luz pulsada realizado neste trabalho fornece informações importantes sobre o comportamento e os efeitos que podem ocorrer durante a aplicação de LP. Assim, podemos destacar que: i) Quanto maior a distância entre a lâmpada e o alvo, menor a energia fornecida, ii) A posição do alvo no eixo horizontal também afeta a magnitude da energia que o atinge, iii) Os parâmetros de operação do equipamento de LP devem ser escolhidos cuidadosamente, pois resultam em emissões de energia bem diferentes.

Gómez-López et al. (2005) também destacam que em uma implementação industrial, a posição e a orientação dos flashes podem determinar a letalidade do microrganismo alvo. As amostras localizadas próximas à lâmpada são mais descontaminadas do que aquelas colocadas mais distantes. Assim, este estudo de mapeamento espacial da fluência em função dos parâmetros de processo mostra que a aplicação industrial da LP no processamento de frangos é um desafio a ser enfrentado com estudos de engenharia e de microbiologia detalhados, considerando os aspectos discutidos. Além disso, outros fatores, como o microrganismo alvo e suas interações com o substrato, serão discutidos no decorrer deste documento.

A resposta do mapeamento em todas as posições e distâncias estudadas tiveram comportamentos e características semelhantes ao detalhado nesta seção e por isso estes resultados não serão apresentados com detalhes e se encontram no ANEXO A.

Figura 14 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulso ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para as posições horizontais da bandeja na distância de 5,15 cm, gerado a partir do planejamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.2 Influência da concentração do inóculo na inativação por PL

Na Tabela 4 estão apresentados os valores das reduções logarítmicas para diferentes concentrações de inóculo, após tratamento com LP realizado em amostras que tiveram contato por 15 minutos com inóculo. Os tratamentos foram realizados com fluências de 1,91 e 5,63 J/cm<sup>2</sup>, no centro da câmara, a uma distância de 6,03 cm entre a amostra e a lâmpada. Para a fluência de 1,91 J/cm<sup>2</sup>, as reduções logarítmicas da *S. Typhimurium* variaram de 0,91 a 1,25 log UFC/cm<sup>2</sup>, independentes das concentrações inoculadas sobre as superfícies dos peitos de frango. A independência da concentração de microrganismos inoculada sobre a inativação do microrganismo alvo foi calculada com 95% de certeza ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 4 - Redução logarítmica em diferentes concentrações e fluências.

<b>Distância (cm)</b>	<b>Fluência J/cm<sup>2</sup></b>	<b>Volume do Inóculo (µL)</b>	<b>Sigla para Concentração inicial de <i>Salmonella</i> no frango</b>	<b>Concentração inicial no frango (log N<sub>0</sub>) (log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Redução Log N/N<sub>0</sub> (log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>
6,03	1,91	50	C1	6,45±0,11	1,25±0,51 <sup>ab</sup>
			C2	5,20±0,10	0,91±0,23 <sup>ab</sup>
			C3	4,29±0,18	1,05±0,27 <sup>ab</sup>
			C4	3,29±0,04	1,11±0,30 <sup>ab</sup>
			C5	2,31±0,03	ND
6,03	5,63	50	C1	6,28±0,03	1,50 ±0,07 <sup>aa</sup>
			C2	5,33±0,05	1,44±0,41 <sup>aa</sup>
			C3	4,34±0,04	1,47±0,20 <sup>aa</sup>
			C4	3,39±0,08	1,46±0,21 <sup>aa</sup>
			C5	2,32±0,02	ND

Os dados apresentam reduções logarítmicas média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais entre C1 a C5 para a mesma fluência indicam não haver diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras maiúsculas iguais entre as fluências (1,91 e 5,63 J/cm<sup>2</sup>) indicam não haver diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. ND = Não detectado sobrevivente.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os valores mínimos de concentrações utilizados neste estudo (Tabela 4) foram selecionados para garantir a contagem de UFC nas placas de Petri, após o tratamento das

amostras com LP. Para as concentrações C5 ( $2,31 \pm 0,03 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) e ( $2,32 \pm 0,02 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) não foi possível a detecção das reduções decimais causadas pela aplicação da LP. Koch et al. (2019) usaram LP para inativar *Salmonella* Typhimurium em pele de suíno contaminada com  $10^2 \text{ UFC/cm}^2$  e também não conseguiram contar a população microbiana restante pela metodologia de contagem de placas.

Na Tabela 4 também estão apresentados os valores das reduções logarítmicas para diferentes concentrações iniciais de inóculo e utilizando fluência de  $5,63 \text{ J/cm}^2$ , com tempo de contato de 15 minutos e distância de 6,03 cm entre a amostra e a lâmpada. As reduções encontradas variaram entre 1,41 e 1,50  $\log \text{ UFC/cm}^2$ , sem diferenças significativas entre os resultados, como demonstrado através do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Assim, novamente, constatou-se que a efetividade do tratamento com LP foi independente da concentração inicial de microrganismos.

Os resultados encontrados na Tabela 4 para a maior fluência ( $5,6 \text{ J/cm}^2$ ) são semelhantes ao encontrado por Paskeviciute et al. (2011), que avaliaram a redução de *S. Typhimurium* com uma concentração inicial de 5,6 log em peitos de frango sem pele. Eles observaram uma redução microbiana de 2  $\log \text{ UFC/cm}^2$ , para uma fluência de  $5,4 \text{ J/cm}^2$ .

Na mesma Tabela podemos observar as diferenças significativas (letras maiúsculas) quando comparamos as reduções para as diferentes fluências avaliadas ( $1,91$  e  $5,63 \text{ J/cm}^2$ ). Esse aumento é explicado pela quantidade de pulsos aplicados, que foi de 1 e 3, respectivamente. Segundo Paskeviciute et al. (2011), a redução bacteriana nas superfícies dos frangos é função de múltiplos fatores, como dose de luz, distância da fonte de luz, número de pulsos e voltagem. Huang et al. (2017) também observou maiores reduções microbianas em tratamentos de *Salmonella* com LP, para maiores fluências, mesmo resultado observado no estudo de Koch et al. (2019).

Resultados semelhantes também foram encontrados por Hierro et al. (2009), avaliando a redução de *Salmonella* Enteritidis na superfície de ovos; eles encontraram maiores reduções decimais para as maiores fluências aplicadas nos tratamentos dos ovos com LP. Eles atribuíram os esses resultados ao efeito fototérmico da LP, mas sem evidência para essa afirmação, pois muitos autores têm interpretado seus resultados em termos do dano fotoquímico da LP. Uma combinação da ação de ambos os mecanismos parece ser o real motivo da influência da fluência no aumento da letalidade da LP.

Dentro desse contexto, para a aplicação da tecnologia de LP em uma planta de processamento de abate de carne de frango, o número de pulsos, e conseqüentemente a fluência, deve ser selecionado com base em estudos prévios, usando o microrganismo alvo, inoculado em amostras representativas da situação industrial. Os estudos devem considerar com referência as recomendações do FDA, que limita a fluência da LP a 12 J/cm<sup>2</sup>, para as aplicações industriais. Essa sugestão se explica pela inexistência de um marco regulatório relativo ao uso da LP no Brasil.

#### 4.3 Influência do tempo de contato inóculo-peito de frango antes do tratamento com LP

Os resultados das reduções decimais médias e respectivos desvios padrões observados para o microrganismo alvo, *S. Typhimurium*, nos peitos de frango, estão apresentados na Tabela 5. Os tempos entre a inoculação e o tratamento com LP foram 1, 5, 15 e 60 min.

Tabela 5 - Redução logarítmica da contagem microbiana em peitos de frango após o tratamento com LP, para diferentes tempos de contato amostra-inóculo

<b>Distância (cm)</b>	<b>Fluência J/cm<sup>2</sup></b>	<b>Volume do Inóculo (µL)</b>	<b>Tempo de migração (min)</b>	<b>Concentração inicial no frango (log N<sub>0</sub>) (log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Redução Log N/N<sub>0</sub> (log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>
6,03	5,63	50	t1=1 min	6,36±0,42	2,62±0,42 <sup>c</sup>
			t2=5 min	6,52±0,18	3,22±0,53 <sup>b</sup>
			t3=15 min	5,80±0,38	1,41±0,18 <sup>a</sup>
			t4=60 min	6,25±0,56	1,63±0,49 <sup>a</sup>

Os dados apresentam reduções logarítmicas média ± desvio padrão. As populações iniciais médias de *S. Typhimurium* variaram entre 5,80 a 6,52 log UFC/cm<sup>2</sup>. Letras minúsculas iguais na mesma coluna, entre t1 a t4 indicam não haver diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Conforme mostrado na Tabela 5, as reduções para os diferentes tempos de migração variaram de 1,41 a 3,22 log UFC/cm<sup>2</sup>. Através do teste de Tukey verificou-se que não houve diferença significativa entre 15 e 60 min de tempo para migração dos microrganismos, indicando que a possível migração da *S. Typhimurium* ocorre nos primeiros 15 min.

Os tempos de contato mais curtos resultaram em maiores reduções logarítmicas, resultados similares ao publicado por Rajkovic et al. (2010). As menores reduções atingidas nos maiores tempos parecem estar associadas com a internalização das células para posições onde não são afetadas pelo tratamento com LP.

Segundo Chimbombi et al. (2013), as bactérias migram na amostra devido ao espaço entre as células na estrutura do alimento. Essa migração ocorre devido à motilidade bacteriana, de acordo com Chaban et al. (2015), os flagelos ajudam as bactérias se moverem na direção de ambientes mais favoráveis às suas sobrevivências e desenvolvimento. A *Salmonella* Typhimurium possui flagelos, organelas que aumentam sua motilidade. Por isso, a combinação da estrutura do alimento com a mobilidade da bactéria são fatores a serem considerados na inferência da internalização das bactérias.

Thomas et al. (1987) concluíram que a motilidade é um fator fundamental na determinação da penetração bacteriana, e que apenas as bactérias móveis podem penetrar na carne. De acordo com Tozzo et al. (2018), a migração de *Salmonella* spp. para áreas internas de um peito de frango pode acontecer em até 6 horas, mesmo que tenha sido previamente congelado. No entanto, sob condições refrigeradas, o pico de migração para o peito de frango ocorre às 24 horas.

As diferenças na redução logarítmica entre as amostras t1 e t2 mostradas na Tabela 6 são difíceis de explicar, mas podem estar relacionadas a diferentes características intrínsecas de cada superfície do peito de frango. A aplicação do tratamento com luz pulsada pode ser realizada em várias etapas do processo, para inativar os microrganismos eventualmente presentes na superfície (devido a contaminações não controláveis). Porém, a partir dos resultados obtidos neste estudo, sabe-se que quanto antes a LP for aplicada aos cortes de frango após o contato do microrganismo com a superfície, maior será a eficácia da LP. Neste contexto, um mapeamento microbiológico nas plantas industriais antes da escolha do momento de tratamento com LP é sugerido.

#### 4.4 Influência da dispersão das gotas de inóculo sobre a superfície do peito de frango

A inserção de diferentes volumes sobre a superfície dos peitos de frango resulta em diferentes concentrações de microrganismos, em UFC/cm<sup>2</sup>. No entanto, o presente estudo mostrou que a redução logarítmica de *Salmonella* é independente da concentração microbiana

no inóculo. Todavia, o estudo do volume de inóculo representado pelo número de gotas inseridas sobre o peito de frango mostra a influência da dispersão da contaminação sobre a letalidade do processo com LP.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores das reduções logarítmicas para os diferentes volumes inoculados, com tempos de migração de 1, 5 e 15 minutos, fluência de 5,63 J/cm<sup>2</sup> e distância amostra-lâmpada de 6,03 cm. Foram observados comportamentos distintos para a alteração do volume. Exceto para as amostras t2, em ambos os volumes no qual a redução variou de 3,22 a 3,28 log UFC/cm<sup>2</sup>, não havendo diferença significativa.

Observa-se que mesmo havendo diferenças entre os volumes avaliados e com reduções próximas umas das outras, as maiores reduções foram obtidas quando um menor volume foi aplicado sobre a amostra. O espalhamento das gotas foi realizado cautelosamente, de forma a evitar as sobreposições. No entanto, o diâmetro da amostra avaliada era pequeno e para o volume de 50 µL foram adicionadas 10 gotas sobre a superfície, o que pode ter acarretado na coalescência das gotas sobreposição das gotas. Segundo Gómez-López et al. (2005) uma sobreposição das células pode resultar em diferentes respostas, isso porque durante o flash, as bactérias que se encontram acima serão facilmente atingidas pela luz e, conseqüentemente, inativadas, enquanto as que estiverem cobertas terão maior chance de sobreviver ao tratamento devido à proteção da luz pelas bactérias localizadas acima.

Tabela 6 - Redução logarítmica para diferentes volumes de inóculo.

<b>Volume do inóculo (µL)</b>	<b>Tempo de migração (min)</b>	<b>Concentração inicial no frango (log N<sub>0</sub>) (log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>Redução Log N/ N<sub>0</sub> (log UFC/cm<sup>2</sup>)</b>
5	t1	5,25±0,38	ND
	t2	5,16±0,29	3,28±0,92 <sup>a</sup>
	t3	5,15±0,35	2,11±0,71 <sup>bc</sup>
50	t1	6,36±0,42	2,62±0,42 <sup>ab</sup>
	t2	6,52±0,18	3,22±0,53 <sup>a</sup>
	t3	5,80±0,38	1,41±0,18 <sup>c</sup>

Letras minúsculas iguais na mesma coluna, entre t1 a t3 para os diferentes volumes indicam não haver diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. t1 = 1 min; t2 = 5 min; t3 = 15 min. ND = Não detectado sobrevivente. Fonte: Elaborado pela autora (2023).

#### 4.5 Influência da camada de água na superfície do frango

Geralmente, o ambiente de abate é um local úmido o que é favorável à presença de uma camada de água na superfície do produto. Além disso, o resfriamento de carcaças por imersão em água fria (*chiller*) ou o uso de sprays de água refrigerada podem ser aplicados, o que gera uma superfície molhada. Para simular estas situações, investigou-se a influência de uma camada de água na superfície do peito de frango sobre a inativação de *S. Typhimurium* por LP.

Na Tabela 7 estão mostrados os resultados das reduções logarítmicas causadas pela LP, observadas em amostras com e sem imersão em um béquer com água antes da inoculação dos microrganismos. Também investigou-se a influência do volume de inóculo, representados por 1 e 10 gotas de inóculo com volumes de 5 e 50  $\mu\text{L}$ , respectivamente, retirados de uma dispersão com a concentração C1. Para este experimento, os tempos de migração avaliados foram de 1, 5 e 15 minutos, a fluência foi de  $5,63 \text{ J/cm}^2$  e a distância entre a amostra e a lâmpada foi de 6,03 cm.

Tabela 7 - Redução logarítmica de *S. Typhimurium* por LP utilizando diferentes volumes de inóculo na presença e ausência de uma camada de água.

Amostra	Volume do inóculo ( $\mu\text{L}$ )	Tempo de migração (min)	Concentração inicial no frango ( $\log N_0$ ) ( $\log \text{UFC/cm}^2$ )	Redução $\log N/N_0$ ( $\log \text{UFC/cm}^2$ )
Com imersão	5	t1	$5,59 \pm 0,15$	ND
		t2	$5,26 \pm 0,46$	$1,40 \pm 0,83^{abAB}$
		t3	$5,29 \pm 0,31$	$1,12 \pm 0,23^{abcAD}$
	50	t1	$6,20 \pm 0,18$	$1,82 \pm 0,26^{aAB}$
		t2	$5,91 \pm 0,14$	$0,96 \pm 0,44^{bcAD}$
		t3	$6,13 \pm 0,09$	$0,36 \pm 0,18^{cD}$
Sem imersão	5	t1	$5,25 \pm 0,38$	ND
		t2	$5,22 \pm 0,28$	$3,28 \pm 0,92^{aC}$
		t3	$5,27 \pm 0,24$	$2,11 \pm 0,71^{bcBE}$
	50	t1	$6,36 \pm 0,42$	$2,62 \pm 0,42^{abCE}$
		t2	$6,52 \pm 0,18$	$3,22 \pm 0,53^{aC}$
		t3	$5,80 \pm 0,38$	$1,41 \pm 0,18^{cAB}$

Letras minúsculas iguais na mesma coluna para o mesmo tratamento (Com Imersão ou Sem Imersão) em diferentes volumes indicam não haver diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna para os diferentes tratamentos (Com Imersão ou Sem Imersão) em diferentes volumes e tempos indicam não haver diferença significativa entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. t1 = 1 min; t2 = 5 min; t3 = 15 min. Fonte: Elaborado pela autora (2023).

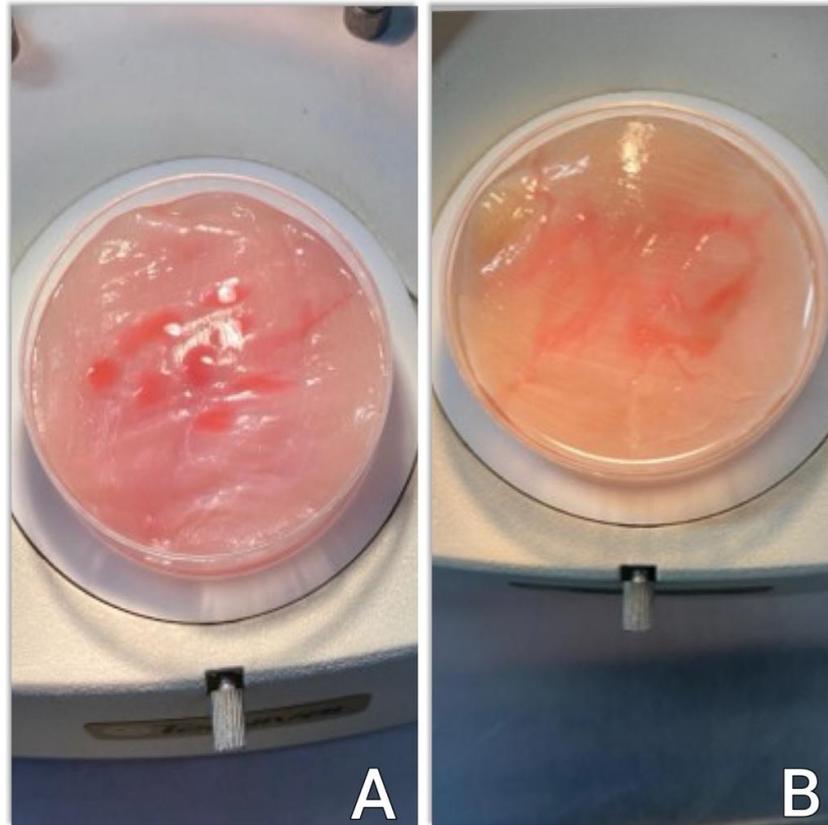
Considerando os resultados dos experimentos realizados para todas as condições, as reduções decimais da contagem microbiana variaram de 0,36 a 3,22 log UFC/cm<sup>2</sup>. As bactérias inoculadas nas amostras previamente imersas em água destilada tiveram menor redução decimal, para todos os tempos de contato entre microrganismo e corte de frango.

Para as amostras com um filme de água (amostras imersas antes da inoculação), a inativação por LP, inoculadas com um volume de inóculo de 5 µL, não houve diferença significativa de inativação para os tempos de migração de 5 e 15 min. Para o tempo de migração de 1 min, a inativação foi máxima. Para o volume de 50 µL, todas as reduções foram diferentes para os tempos de migração diferentes; quanto maior o tempo de migração, menor foi a inativação por LP, corroboram com os resultados apresentados no item 4.3 desse estudo. Além disso, foi possível verificar que a camada de água superficial apresenta um efeito protetor para a *S. Typhimurium*, provavelmente pelo aumento da mobilidade do microrganismo na camada de água. Para volumes diferentes de inoculação e mesmo tempo de contato, quanto maior o volume de inóculo, menor a inativação.

Através do teste de Tukey, nota-se um perfil de redução diferente para cada situação, mostrando que um parâmetro pode interferir no outro e ocasionar diferentes respostas. Esses dados nos mostram a importância de definirmos qual o melhor conjunto de parâmetros, de acordo com a realidade do processo industrial. Comparando os resultados foi possível verificar que a camada de água superficial apresenta um efeito protetor para a *S. Typhimurium*, sendo que a mobilidade do microrganismo pode ter sido ajudada pela água.

Para elucidar o efeito da camada de água sobre a superfície do peito de frango, realizou-se um experimento utilizando corante na suspensão microbiana para avaliar o espalhamento das gotas de inóculo quando a superfície contém a camada de água (Figura 15). Na Figura 15 (A) é apresentada a superfície do peito de frango sem imersão em camada líquida, contendo 10 gotas de inóculo. As gotas nessa imagem permanecem sem espalhamento, devido à alta tensão interfacial na superfície água-frango. A Figura 15 (B) mostra fotografias da amostra imersa em água antes da inoculação. Nesta imagem, nota-se que o inóculo se espalha mais facilmente sobre a superfície do frango.

Figura 15 – Amostras submetidas a inoculação com corante para os tratamentos A) sem e B) com imersão.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O mecanismo protetor da camada de água está relacionado com o espalhamento mais rápido das gotas de inóculo sobre a película de água, que facilitou a movimentação das bactérias para camadas de líquido mais distantes da superfície. Essa hipótese é corroborada pela redução da inativação com o aumento do tempo entre a inoculação e o tratamento com LP (aumento do tempo de migração). Por outro lado, nas amostras sem a película de água na superfície (amostras sem imersão), o aumento do tempo de migração de 1 min para 5 min foi suficiente para que as bactérias se espalhassem na superfície e ficassem mais expostas à LP. Porém, quando o tempo de migração aumentou para 15 min, houve uma redução da inativação microbiana, provavelmente devido à internalização das células, que penetraram nas rugosidades e nos espaços intercelulares da carne.

## 5 CONCLUSÕES

O mapeamento espacial da fluência no interior da câmara de tratamento por Luz Pulsada de Alta Energia (LP) é crucial para entender as diferenças de tratamento que as amostras recebem em um dado tempo. As distâncias vertical e horizontal entre a lâmpada e o alvo define a fluência incidente.

Os resultados mostraram claramente que a inativação causada pela LP é independente da concentração, na faixa estudada para a *Salmonella* Typhimurium. Esse resultado facilita a aplicação industrial da LP, pois o ambiente industrial é dinâmico e as contaminações podem variar significativamente com o tempo e entre as amostras de diferentes lotes. Em todos os casos, a aplicação da LP causará a mesma redução decimal do microrganismo alvo, para uma dada fluência, resultados de parâmetros de processo pré-estabelecidos (Voltagem e duração do pulso ou dos pulsos de luz). O número de pulsos, e conseqüentemente a fluência, são fatores decisivos na inativação dos microrganismos através da tecnologia de LP. Para as aplicações industriais, esses parâmetros devem ser selecionados com base em estudos prévios, considerando também as recomendações do FDA, que limita a fluência da LP a 12 J/cm<sup>2</sup>.

No presente trabalho, a LP foi avaliada para a inativação de *Salmonella* em peitos de frango. O tratamento com luz pulsada foi capaz de reduzir a contagem de *Salmonella* Typhimurium em até 3,28 logs em superfícies de peito de frango, usando fluências abaixo dos limites aprovados pela FDA.

Os resultados deste estudo mostraram que a *Salmonella* interage com o substrato, o que influencia a sua inativação por LP. Além disso, a presença de uma camada de água na superfície do peito de frango também age como um fator protetor contra a ação da LP.

Os resultados relativos à influência da dispersão espacial da contaminação na superfície do peito de frango sobre a eficiência da inativação sugerem uma possível coalescência das gotas depositadas sobre a superfície das amostras. Isso formaria um filme líquido, que pode influenciar a inativação dos microrganismos por LP. No entanto, é necessário aprofundar o estudo do comportamento das gotas no substrato, utilizando goniômetros e imagens, por isso mais estudos são necessários.

Este estudo mostrou também que o tempo decorrido entre a contaminação do peito de frango e a aplicação da LP é crucial para a eficácia da inativação de *Salmonella*. Esses resultados sugerem que uma porcentagem dos microrganismos (*Salmonella*) migra rapidamente

para regiões do tecido superficial onde a luz não incide. Esse efeito de sombreamento é a hipótese mais razoável para essa redução da letalidade da LP para maiores tempos disponíveis para a internalização. Assim, um profundo conhecimento da linha de processamento é fundamental para escolher os pontos onde a eficácia da aplicação da LP será maior. Aplicar a LP imediatamente após as etapas do processo em que o peito de frango é mais susceptível à contaminação é a melhor escolha para aproveitar a sua letalidade.

Ainda que mais pesquisas sejam necessárias antes da aplicação efetiva na produção em larga escala no processamento de frangos, a LP mostrou ser uma tecnologia promissora para reduzir a contaminação de produtos por *Salmonella* em abatedouros de aves.

## REFERÊNCIAS

- ABIDA, J.; RAYEES, B.; MASOODI, F. A. Pulsed light technology: A novel method for food preservation. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 3, p. 839–848, 2014.
- AGREGÁN, R. et al. High-pressure processing in inactivation of Salmonella spp. in food products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 107, n. November 2020, p. 31–37, 2021.
- AGUILÓ-AGUAYO, I. et al. Pulsed light effects on surface decontamination, physical qualities and nutritional composition of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 86, p. 29–36, 2013.
- ANDERSON, T. C. et al. Multistate outbreak of human Salmonella Typhimurium infections linked to live poultry from agricultural feed stores and mail-order hatcheries, United States 2013. **One Health**, v. 2, p. 144–149, 2016.
- ASHRAFUDOULLA, M. et al. Isolation and characterization of Salmonella spp. from food and food contact surfaces in a chicken processing factory. **Poultry Science**, v. 100, n. 8, p. 101234, 2021.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, A. Relatório Anual. v. 148, p. 148–162, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, A. Relatório Anual. **Associação Brasileira de Proteína Animal**, p. 160, 2021.
- AVALOS LLANO, K. R. et al. Impact of pulsed light treatments on antioxidant characteristics and quality attributes of fresh-cut apples. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 33, p. 206–215, 2016.
- BAPTISTA, E. et al. Pulsed Light Application for Campylobacter Control on Poultry Meat and Its Effect on Colour and Volatile Profile. **Foods**, v. 11, n. 18, 2022.
- BARBA, F. J. et al. Mild processing applied to the inactivation of the main foodborne bacterial pathogens: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 66, p. 20–35, 2017.
- BARBHUIYA, R. I.; SINGHA, P.; SINGH, S. K. **A comprehensive review on impact of non-thermal processing on the structural changes of food components. Food Research International** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2021.

BHAGAT, B.; CHAKRABORTY, S. Potential of pulsed light treatment to pasteurize pomegranate juice: Microbial safety, enzyme inactivation, and phytochemical retention. **Lwt**, v. 159, n. July 2021, p. 113215, 2022.

BOLDER, N. M. Microbial challenges of poultry meat production. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, n. 3, p. 401–411, 2007.

BOORE, A. L. et al. Salmonella enterica infections in the United States and assessment of coefficients of variation: A Novel approach to identify epidemiologic characteristics of individual serotypes, 1996-2011. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–11, 2015.

BOUBENDIR, S. et al. Salmonella contamination of broiler chicken carcasses at critical steps of the slaughter process and in the environment of two slaughter plants: Prevalence, genetic profiles, and association with the final carcass status. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 2, p. 321–332, 2021.

BRAR, P. S. et al. **Value Addition of Milk and Meat: A Push to Entrepreneurship [E-book]**. [s.l: s.n.].

BUNCIC, S.; SOFOS, J. Interventions to control Salmonella contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 641–655, 2012.

CARCIOFI, B. A. M.; LAURINDO, J. B. Experimental results and modeling of poultry carcass cooling by water immersion. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 447–453, 2010.

CHARLES, F. et al. Pulsed light treatment as new method to maintain physical and nutritional quality of fresh-cut mangoes. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 190–195, 2013.

CHEN, H. et al. Nontyphoid Salmonella Infection : Microbiology , Clinical Features , and Antimicrobial Therapy. **Pediatrics and Neonatology**, v. 54, n. 3, p. 147–152, 2013.

DAR, M. A. et al. Salmonella typhimurium in poultry: A review. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. 2, p. 345–354, 2017.

DAVE, D.; GHALY, A. E. Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: A critical review. **American Journal of Agricultural and Biological Science**, v. 6, n. 4, p. 486–510, 2011.

DJEBBI-SIMMONS, D. et al. Survival and inactivation of Salmonella enterica serovar Typhimurium on food contact surfaces during log, stationary and long-term stationary phases. **Food Microbiology**, v. 84, n. April, p. 103272, 2019.

EL-SAADONY, M. T. et al. The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview. **Poultry Science**, v. 101, n. 4, p. 101716, 2022.

FERNÁNDEZ, A.; THOMPSON, A. The inactivation of Salmonella by cold atmospheric plasma treatment. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 678–684, 2012.

FERNÁNDEZ, M. et al. Application of Pulsed Light to Sliced Cheese: Effect on Listeria Inactivation, Sensory Quality and Volatile Profile. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 8, p. 1335–1344, 2016.

FIALA, N. Meeting the demand: An estimation of potential future greenhouse gas emissions from meat production. **Ecological Economics**, v. 67, n. 3, p. 412–419, 2008.

GAMBLE, G. R. et al. Effect of simulated sanitizer carryover on recovery of salmonella from broiler carcass rinsates. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 5, p. 710–714, 2016.

GART, E. V. et al. Salmonella typhimurium and multidirectional communication in the gut. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1–18, 2016.

GOLDEN, C. E.; ROTHROCK, M. J.; MISHRA, A. Mapping foodborne pathogen contamination throughout the conventional and alternative poultry supply chains. **Poultry Science**, v. 100, n. 7, p. 101157, 2021.

GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. et al. Pulsed light for food decontamination: a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 9, p. 464–473, 2007.

GRANDIN, T. **Livestock handling and transport**. [s.l: s.n.].

GUERIN, M. T. et al. The change in prevalence of Campylobacter on chicken carcasses during processing: A systematic review. **Poultry Science**, v. 89, n. 5, p. 1070–1084, 2010.

HIERRO, E. et al. Inactivation of Salmonella enterica serovar Enteritidis on shell eggs by pulsed light technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 125–130, 2009.

HUANG, Y. et al. Pulsed light inactivation of murine norovirus, Tulane virus, Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in suspension and on berry surfaces. **Food Microbiology**, v. 61, p. 1–4, 2017.

HUE, O. et al. Campylobacter contamination of broiler caeca and carcasses at the slaughterhouse and correlation with Salmonella contamination. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 862–868, 2011.

HWANG, H. J.; KIM, G. A.; CHUNG, M. S. Impact of factors affecting the efficacy of intense pulsed light for reducing *Bacillus subtilis* spores. **Food Science and Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 1321–1329, 2021.

IFSAC. Foodborne illness source attribution estimates for 2019 for *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Campylobacter* using multi-year outbreak surveillance data, United States. **US Department of Health and Human Services, CDC**, n. October, p. 1–12, 2021.

INNOCENTE, N. et al. Effect of pulsed light on total microbial count and alkaline phosphatase activity of raw milk. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 108–112, 2014.

IZQUIER, A.; GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. Modeling the pulsed light inactivation of microorganisms naturally occurring on vegetable substrates. **Food Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1170–1174, 2011.

JAJERE, S. M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, v. 12, n. 4, p. 504–521, 2019.

KEKLIK, N. M.; DEMIRCI, A.; PURI, V. M. Decontamination of unpackaged and vacuum-packaged boneless chicken breast with pulsed ultraviolet light. **Poultry Science**, v. 89, n. 3, p. 570–581, 2010.

KRAMER, B.; WUNDERLICH, J.; MURANYI, P. Recent findings in pulsed light disinfection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 830–856, 2017.

KRAMER, B.; WUNDERLICH, J.; MURANYI, P. Inactivation of *Listeria innocua* on packaged meat products by pulsed light. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 21, n. December 2018, p. 100353, 2019.

KROUPITSKI, Y. et al. Internalization of *Salmonella enterica* in leaves is induced by light and involves chemotaxis and penetration through open stomata. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 19, p. 6076–6086, 2009.

L., P.; SORVILLO, F.; KUO, T. **The Burden of Salmonellosis in the United States**. [s.l: s.n.].

LASAGABASTER, A.; MARTÍNEZ DE MARAÑÓN, I. Comparative Study on the Inactivation and Photoreactivation Response of *Listeria monocytogenes* Seafood Isolates and a *Listeria innocua* Surrogate after Pulsed Light Treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 10, p. 1931–1935, 2017.

LIU, X. et al. Wetting raw almonds to enhance pulse light inactivation of Salmonella and preserve quality. **Food Control**, v. 125, n. February, p. 107946, 2021.

LÓPEZ-ANDRÉS, J. J. et al. Environmental impact assessment of chicken meat production via an integrated methodology based on LCA, simulation and genetic algorithms. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 477–491, 2018.

LÓPEZ-ROMERO, J. C. et al. Effects and interactions of gallic acid, eugenol and temperature on thermal inactivation of Salmonella spp. in ground chicken. **Food Research International**, v. 103, n. August 2017, p. 289–294, 2018.

LORETZ, M.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: A literature survey. **Food Control**, v. 21, n. 6, p. 791–804, 2010.

MAHENDRAN, R. et al. Recent advances in the application of pulsed light processing for improving food safety and increasing shelf life. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, n. December 2018, p. 67–79, 2019a.

MAHENDRAN, R. et al. Recent advances in the application of pulsed light processing for improving food safety and increasing shelf life. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, n. December 2018, p. 67–79, 2019b.

MALMALI, M. et al. Evaluation of ultrafiltration membranes for treating poultry processing wastewater. **Journal of Water Process Engineering**, v. 22, n. November 2017, p. 218–226, 2018.

MANCINELLI, A. C. et al. Mobile poultry processing unit as a resource for small poultry farms: Planning and economic efficiency, animal welfare, meat quality and sanitary implications. **Animals**, v. 8, n. 12, p. 1–16, 2018.

MENGARDA BUOSI, D. T. et al. Effective pulsed light treatments for inactivating Salmonella enterica serotypes. **Food Control**, v. 135, n. July 2021, p. 108776, 2022.

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: Current state and future outlook and challenges. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. 2, p. 245–256, 2017.

NICORESCU, I. et al. Pulsed light inactivation of Bacillus subtilis vegetative cells in suspensions and spices. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 151–157, 2013.

OECD-FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2021–2030**. [s.l.: s.n.].

OZER, N. P.; DEMIRCI, A. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* inoculated on raw salmon fillets by pulsed UV-light treatment. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 4, p. 354–360, 2006.

PARK, H. J. et al. Prevalence analysis and molecular characterization of salmonella at different processing steps in broiler slaughter plants in south korea. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. M2822–M2826, 2015.

PARRY-HANSON KUNADU, A.; OTWEY, R. Y.; MOSI, L. Microbiological quality and *Salmonella* prevalence, serovar distribution and antimicrobial resistance associated with informal raw chicken processing in Accra, Ghana. **Food Control**, v. 118, n. April, p. 107440, 2020.

PISOSCHI, A. M. et al. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922–935, 2018.

PREETHA, P. et al. Effect of pulsed light treatment on inactivation kinetics of *Escherichia coli* (MTCC 433) in fruit juices. **Food Control**, v. 121, n. August 2020, p. 107547, 2021.

PUÉRTOLASA, E. et al. Aplicación industrial de los pulsos eléctricos de alto voltaje para la pasteurización de alimentos: revisión de su viabilidad técnica y comercial. **CYTA - Journal of Food**, v. 11, n. 1, p. 81–88, 2013.

PUI, C. F. et al. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 337–342, 2011.

RAJKOVIC, A. et al. Pulsed UV light as an intervention strategy against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of a meat slicing knife. **Journal of Food Engineering**, v. 100, n. 3, p. 446–451, 2010.

RICCIARDI, F. E. et al. Effect of pulsed light on microbial inactivation, sensory properties and protein structure of fresh ricotta cheese. **Lwt**, v. 139, n. November 2020, p. 110556, 2021.

ROTHROCK, M. J. et al. The characterization of *Salmonella enterica* serotypes isolated from the scalding tank water of a commercial poultry processing plant: Recovery of a multidrug-resistant Heidelberg strain. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 467–472, 2015.

SARAIVA, S. et al. Impact of pre-slaughter factors on welfare of broilers. **Veterinary and Animal Science**, v. 10, n. October, p. 100146, 2020.

SCHMIDT, J. W. et al. Prevalence, enumeration, serotypes, and antimicrobial resistance phenotypes of *Salmonella enterica* isolates from carcasses at two large united states pork processing plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2716–2726, 2012.

SILVA, F. V. M.; GIBBS, P. A. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 695–699, 2012.

SKARP, C. P. A.; HÄNNINEN, M. L.; RAUTELIN, H. I. K. Campylobacteriosis: The role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 103–109, 2016.

SÖBELI, C.; UYARCAN, M.; KAYAARDI, S. Pulsed UV-C radiation of beef loin steaks: Effects on microbial inactivation, quality attributes and volatile compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 67, n. November 2020, 2021.

SOFOS, J. N.; GEORNARAS, I. Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 2–14, 2010.

THUNG, T. Y. et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. **Poultry Science**, v. 95, n. 8, p. 1888–1893, 2016.

TROY, D. J. et al. Sustainable and consumer-friendly emerging technologies for application within the meat industry: An overview. **Meat Science**, v. 120, p. 2–9, 1 out. 2016.

TROY, D. J.; KERRY, J. P. Consumer perception and the role of science in the meat industry. **Meat Science**, v. 86, n. 1, p. 214–226, 2010.

VALDIVIA-NÁJAR, C. G. et al. Modeling the Inactivation of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in Fresh-Cut Tomato Treated with Pulsed Light. **Food and Bioprocess Technology**, v. 10, n. 2, p. 266–274, 2017.

VOIDAROU, C. et al. Microbial challenges of poultry meat production. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 341–343, 2011.

WANG, T. et al. Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. **Water Research**, v. 39, n. 13, p. 2921–2925, 2005.

WIBISONO, F. M. et al. A review of salmonellosis on poultry farms: Public health importance. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 11, n. 9, p. 481–486, 2020.

ZHU, Y. et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in Salmonella strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, n. August, p. 43–51, 2017.

ZHU, Y. et al. Antimicrobial mechanism of pulsed light for the control of Escherichia coli O157:H7 and its application in carrot juice. **Food Control**, v. 106, n. June, p. 106751, 2019.

ZHUANG, H. et al. In-Package Air Cold Plasma Treatment of Chicken Breast Meat: Treatment Time Effect. **Journal of Food Quality**, v. 2019, 2019.

**ANEXO A – Resultado do planejamento experimental em diferentes parâmetros.**

Tabela 5 - Mapeamento na distância de 4,79 cm.

Ordem	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Fluências (J/cm <sup>2</sup> )				
	Voltagem	Largura do pulso	Voltagem (V)	Largura do pulso (μs)	-2x	-x	0	x	2x
<b>1</b>	-1	-1	2000	210	0,39	0,52	0,60	0,54	0,38
<b>2</b>	-1	0	2000	420	0,63	0,75	0,87	0,79	0,62
<b>3</b>	-1	1	2000	630	0,89	0,97	1,03	0,99	0,88
<b>4</b>	0	-1	2500	210	0,70	0,79	0,88	0,93	0,68
<b>5</b>	0	0	2500	420	1,33	1,41	1,47	1,42	1,32
<b>6</b>	0	1	2500	630	1,88	2,05	2,18	2,09	1,87
<b>7</b>	1	-1	3000	210	1,17	1,39	1,44	1,34	1,16
<b>8</b>	1	0	3000	420	2,25	2,33	2,42	2,35	2,24
<b>9</b>	1	1	3000	630	3,14	3,32	3,39	3,33	3,14

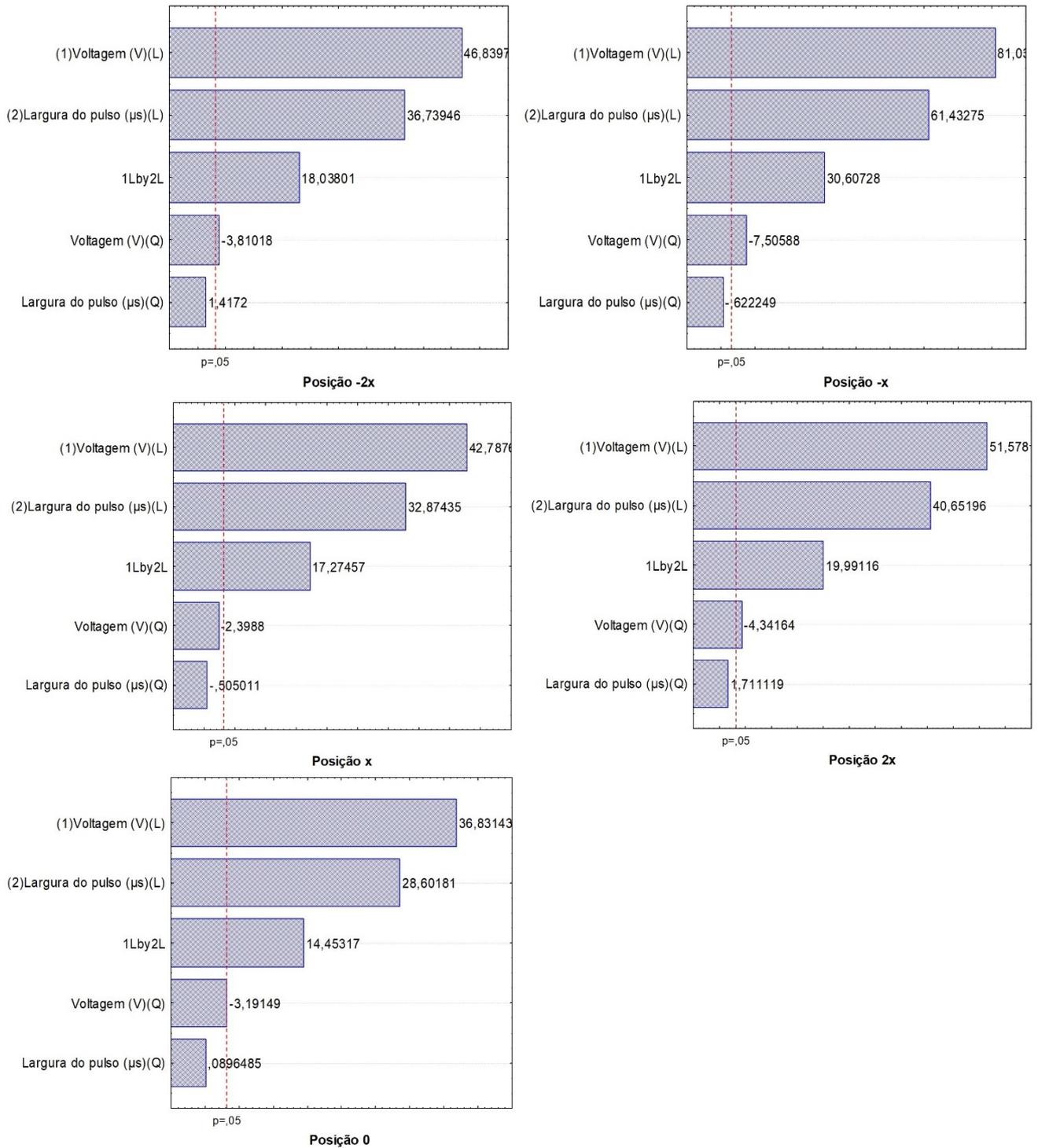
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 6 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 4,79 cm.

		<b>Fatores</b>				
<b>Posição</b>		<b>Voltagem Linear</b>	<b>Voltagem Quadrática</b>	<b>Largura do pulso Linear</b>	<b>Largura do pulso Quadrático</b>	<b>Voltagem*Largura do pulso Linear</b>
<b>-2x</b>	F	2193,9	14,517	1349,78	2,008	325,370
	p	0,0000	0,0318	0,0000	0,2514	0,0004
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,998		
<b>-x</b>	F	6566,6	56,338	3773,98	0,387	936,805
	p	0,0000	0,0049	0,0000	0,5779	0,0000
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,999		
<b>0</b>	F	1356,5	10,186	818,064	0,008	208,894
	p	0,0000	0,0496	0,0000	0,9342	0,0007
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,996		
<b>x</b>	F	1830,8	5,754	1080,723	0,255	298,411
	p	0,0000	0,0959	0,0000	0,6483	0,0004
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,997		
<b>2x</b>	F	2660,3	18,850	1652,58	2,928	399,646
	p	0,0000	0,0225	0,0000	0,1855	0,0002
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,998		

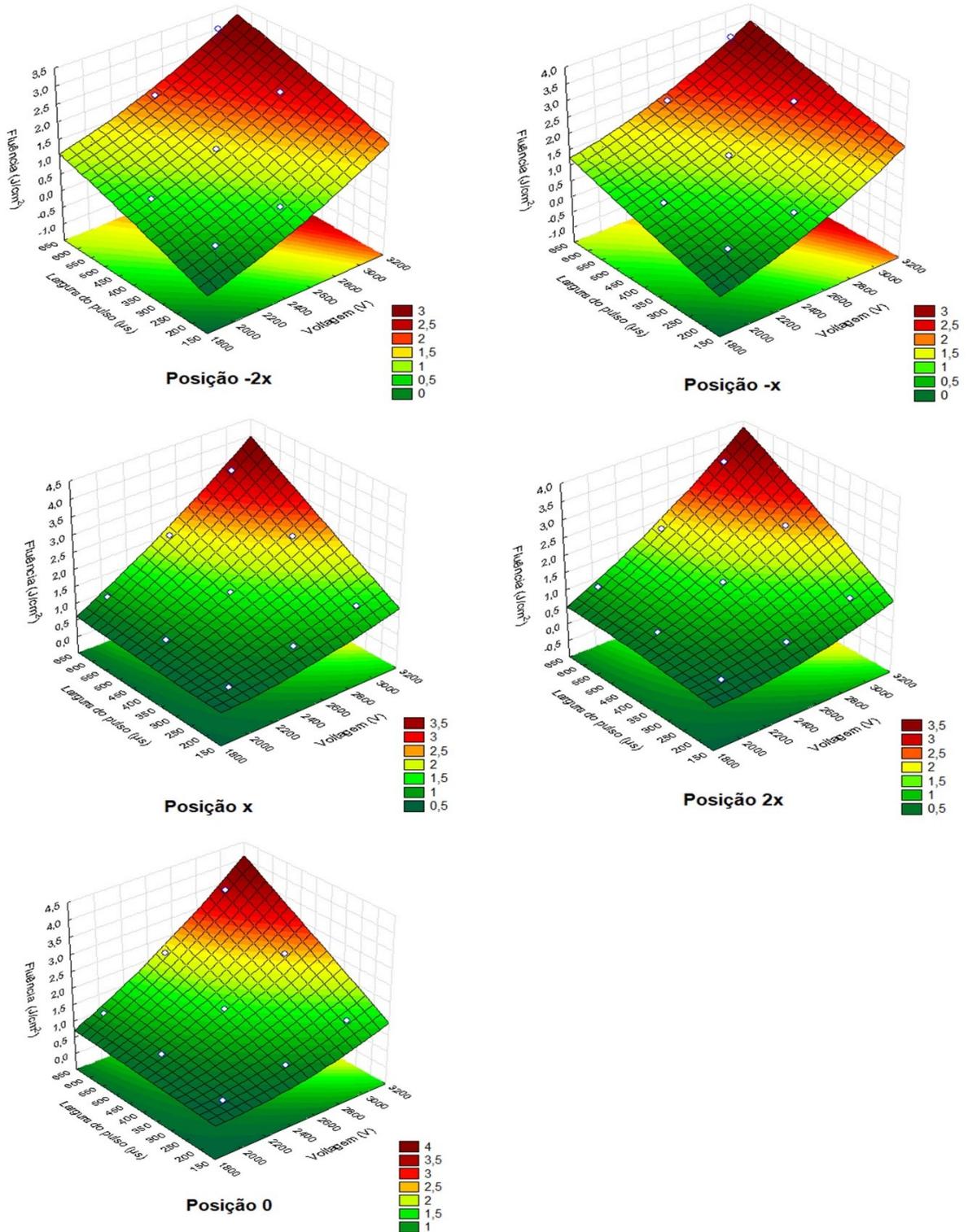
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 15- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 4,79 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da camara de luz pulsada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 16 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulsos ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 4,79 cm , gerado a partir do planejamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 7 - Mapeamento na distância de 6,41 cm.

Ordem	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Fluências (J/cm <sup>2</sup> )				
	Voltagem	Largura do pulso	Voltagem (V)	Largura do pulso (μs)	-2x	-x	0	x	2x
<b>1</b>	-1	-1	2000	210	0,22	0,29	0,30	0,28	0,24
<b>2</b>	-1	0	2000	420	0,40	0,50	0,56	0,51	0,40
<b>3</b>	-1	1	2000	630	0,54	0,65	0,73	0,64	0,54
<b>4</b>	0	-1	2500	210	0,41	0,52	0,57	0,49	0,42
<b>5</b>	0	0	2500	420	0,75	0,93	0,98	0,90	0,73
<b>6</b>	0	1	2500	630	1,01	1,25	1,34	1,27	1,04
<b>7</b>	1	-1	3000	210	0,65	0,85	0,89	0,86	0,66
<b>8</b>	1	0	3000	420	1,23	1,48	1,62	1,54	1,22
<b>9</b>	1	1	3000	630	1,66	2,06	2,18	2,10	1,70

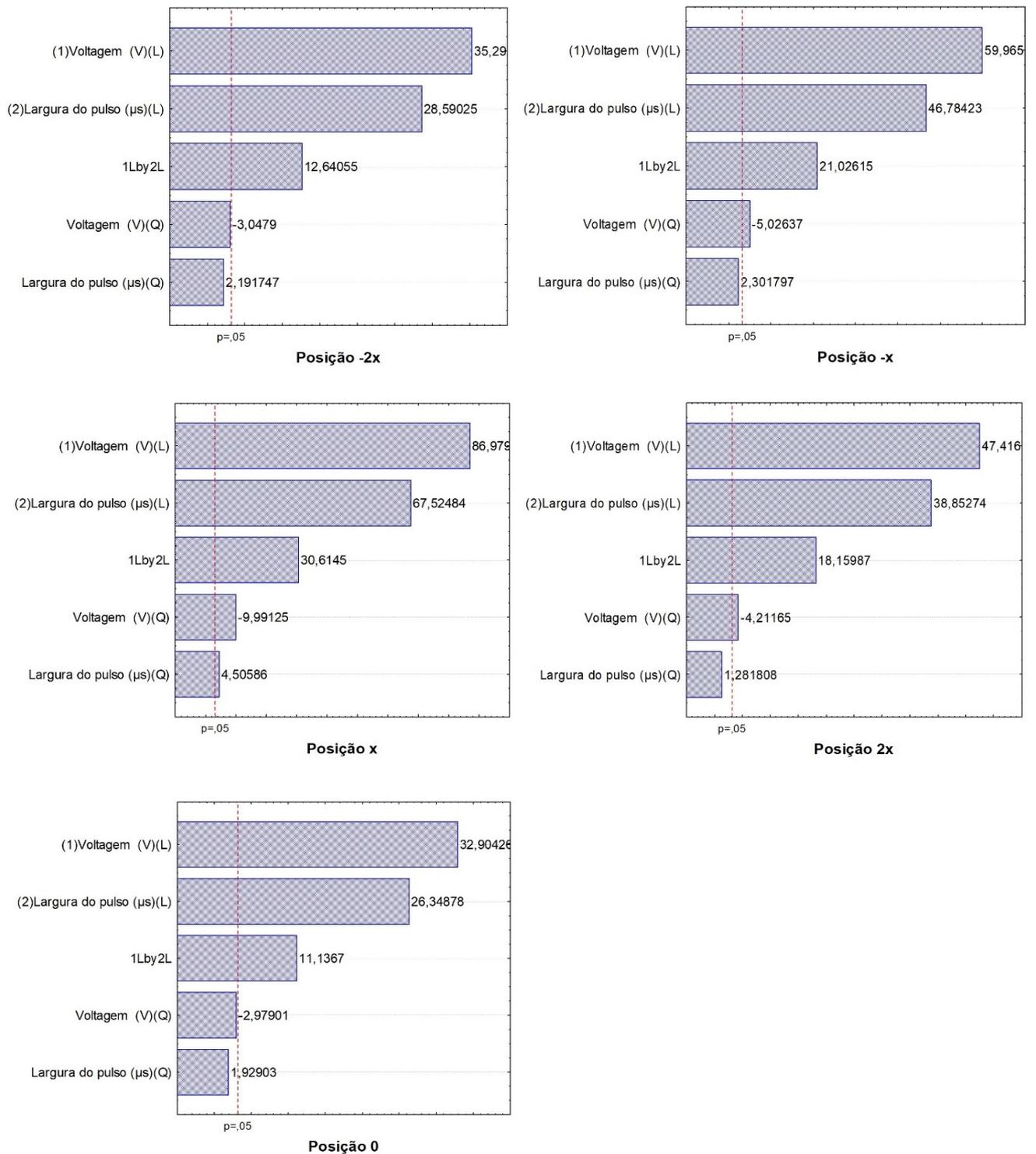
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 8 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 6,41 cm.

<b>Fatores</b>						
<b>Posição</b>	<b>Voltagem Linear</b>	<b>Voltagem Quadrática</b>	<b>Largura do pulso Linear</b>	<b>Largura do pulso Quadrático</b>	<b>Voltagem* Largura do pulso Linear</b>	
<b>-2x</b>	F	1245,6	9,290	817,403	4,804	159,783
	p	0,0000	0,0555	0,0000	0,1161	0,011
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,996		
<b>-x</b>	F	3595,8	25,264	2188,76	5,298	442,099
	p	0,0000	0,0152	0,0000	0,1048	0,0002
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,998		
<b>0</b>	F	1082,7	8,874	694,26	3,721	124,026
	p	0,0000	0,0586	0,0001	0,1493	0,0015
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,995		
<b>x</b>	F	7565,4	99,825	4559,603	20,303	937,247
	p	0,0000	0,0021	0,0000	0,0204	0,0000
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,999		
<b>2x</b>	F	2248,3	17,738	1509,535	1,643	329,781
	p	0,0000	0,0244	0,0000	0,2899	0,0003
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,998		

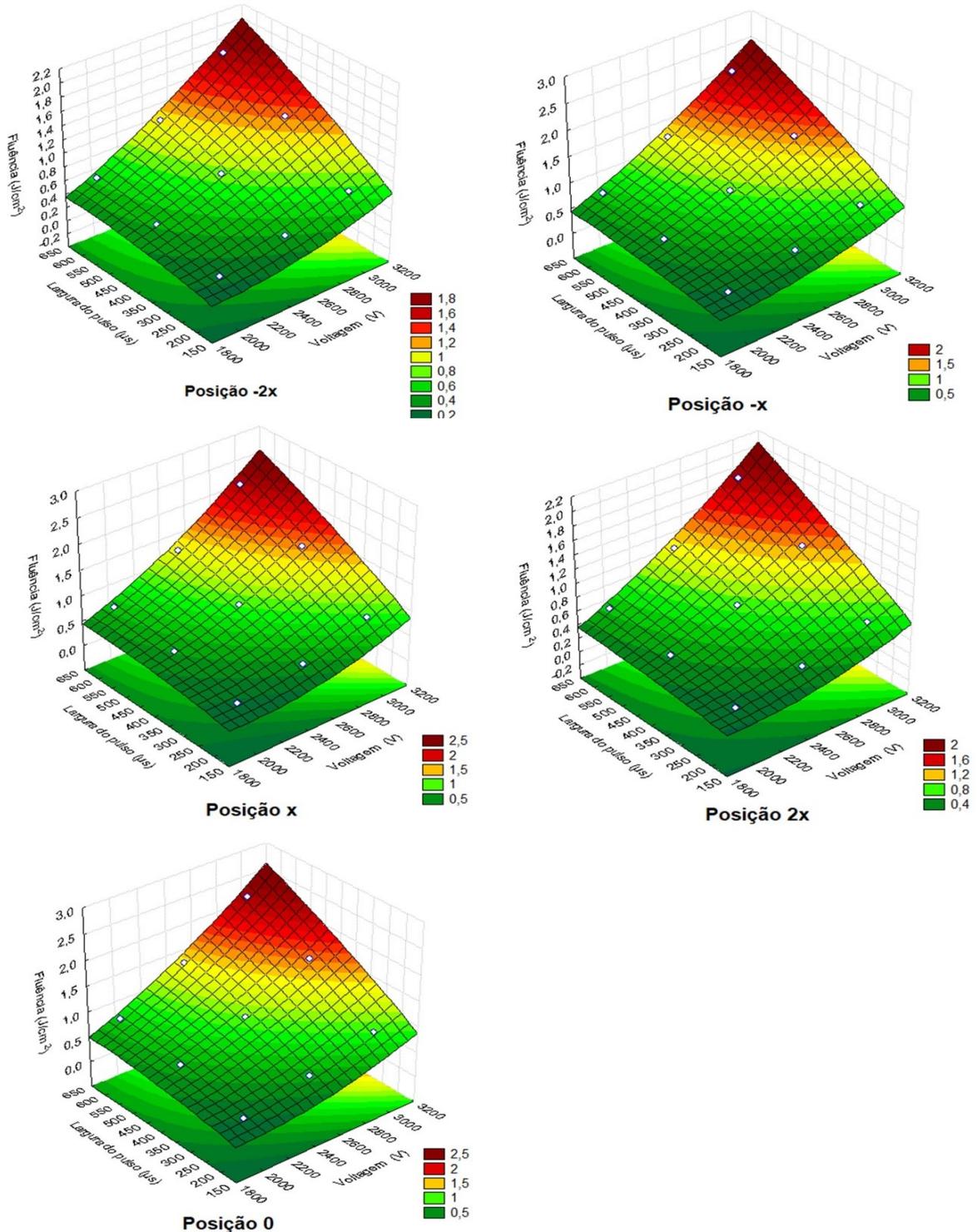
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 17- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 6,41 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da camara de luz pulsada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023)

Figura 18 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulso ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 6,41 cm, gerado a partir do planejamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 9 - Mapeamento na distância de 7,79 cm.

Ordem	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Fluências (J/cm <sup>2</sup> )				
	Voltagem	Largura do pulso	Voltagem (V)	Largura do pulso (μs)	-2x	-x	0	x	2x
<b>1</b>	-1	-1	2000	210	0,20	0,23	0,24	0,24	0,20
<b>2</b>	-1	0	2000	420	0,34	0,40	0,44	0,40	0,36
<b>3</b>	-1	1	2000	630	0,45	0,55	0,58	0,55	0,45
<b>4</b>	0	-1	2500	210	0,34	0,42	0,45	0,42	0,34
<b>5</b>	0	0	2500	420	0,63	0,76	0,80	0,76	0,62
<b>6</b>	0	1	2500	630	0,87	1,09	1,13	1,08	0,88
<b>7</b>	1	-1	3000	210	0,57	0,69	0,73	0,70	0,56
<b>8</b>	1	0	3000	420	1,08	1,29	1,41	1,31	1,08
<b>9</b>	1	1	3000	630	1,45	1,78	1,87	1,76	1,44

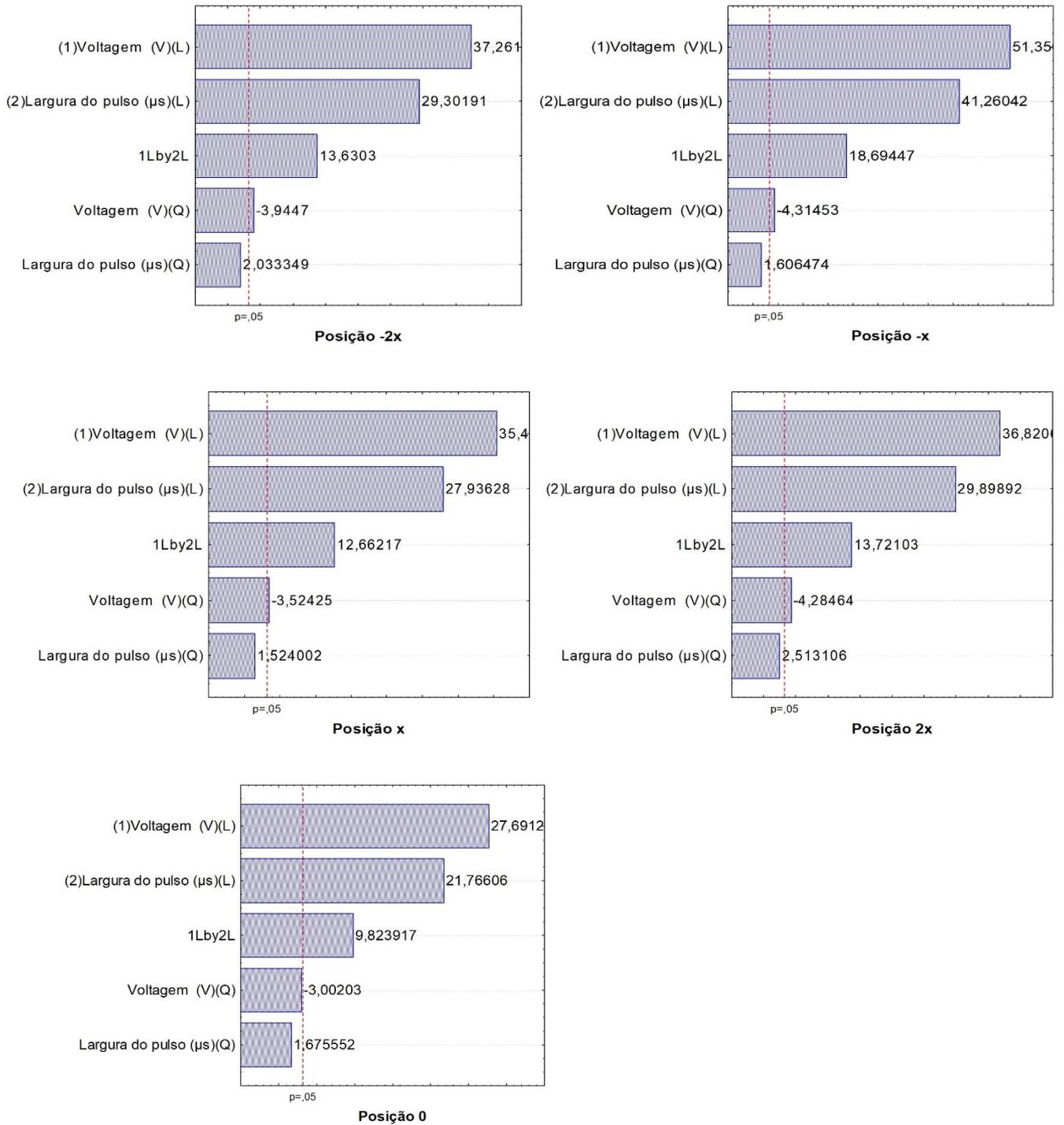
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 10 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 7,79 cm.

<b>Fatores</b>						
<b>Posição</b>	<b>Voltagem Linear</b>	<b>Voltagem Quadrática</b>	<b>Largura do pulso Linear</b>	<b>Largura do pulso Quadrático</b>	<b>Voltagem* Largura do pulso Linear</b>	
<b>-2x</b>	F	1388,4	15,561	858,602	4,135	185,785
	p	0,0000	0,0290	0,0000	0,1349	0,0008
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,997		
<b>-x</b>	F	2637,5	18,615	1702,422	2,581	349,483
	p	0,0000	0,0229	0,0000	0,2065	0,0003
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,998		
<b>0</b>	F	766,8	9,012	473,761	2,807	96,509
	p	0,0001	0,0575	0,0002	0,1924	0,0022
	R <sup>2</sup>			0,997		
	R <sup>2</sup> adj.			0,994		
<b>x</b>	F	1258,1	12,420	780,435	2,323	160,331
	p	0,0000	0,0387	0,0001	0,2249	0,0010
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,996		
<b>2x</b>	F	1355,8	18,358	893,946	6,316	188,267
	p	0,0000	0,0233	0,0000	0,0867	0,0008
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,997		

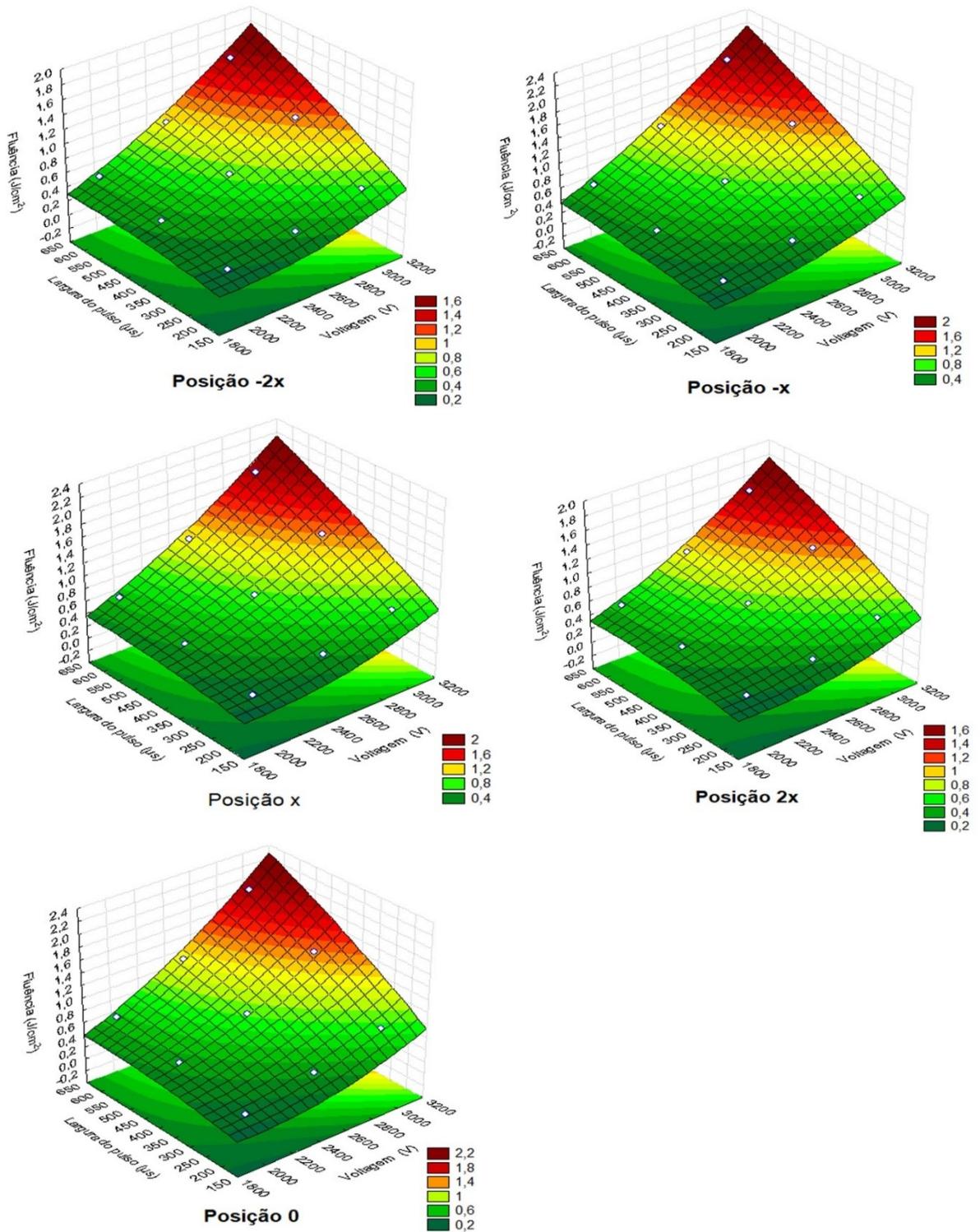
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 19- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 7,79 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da câmara de luz pulsada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 20 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulsos ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 7,79 cm, gerado a partir do planejamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 11 - Mapeamento na distância de 9,50 cm.

Ordem	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Fluências (J/cm <sup>2</sup> )				
	Voltagem	Largura do pulso	Voltagem (V)	Largura do pulso (μs)	-2x	-x	0	x	2x
<b>1</b>	-1	-1	2000	210	0,16	0,19	0,20	0,19	0,16
<b>2</b>	-1	0	2000	420	0,28	0,33	0,37	0,34	0,30
<b>3</b>	-1	1	2000	630	0,38	0,43	0,49	0,48	0,37
<b>4</b>	0	-1	2500	210	0,30	0,37	0,37	0,36	0,30
<b>5</b>	0	0	2500	420	0,53	0,63	0,67	0,64	0,53
<b>6</b>	0	1	2500	630	0,70	0,87	0,93	0,90	0,72
<b>7</b>	1	-1	3000	210	0,46	0,58	0,61	0,59	0,48
<b>8</b>	1	0	3000	420	0,87	1,08	1,12	1,06	0,86
<b>9</b>	1	1	3000	630	1,19	1,46	1,53	1,46	1,21

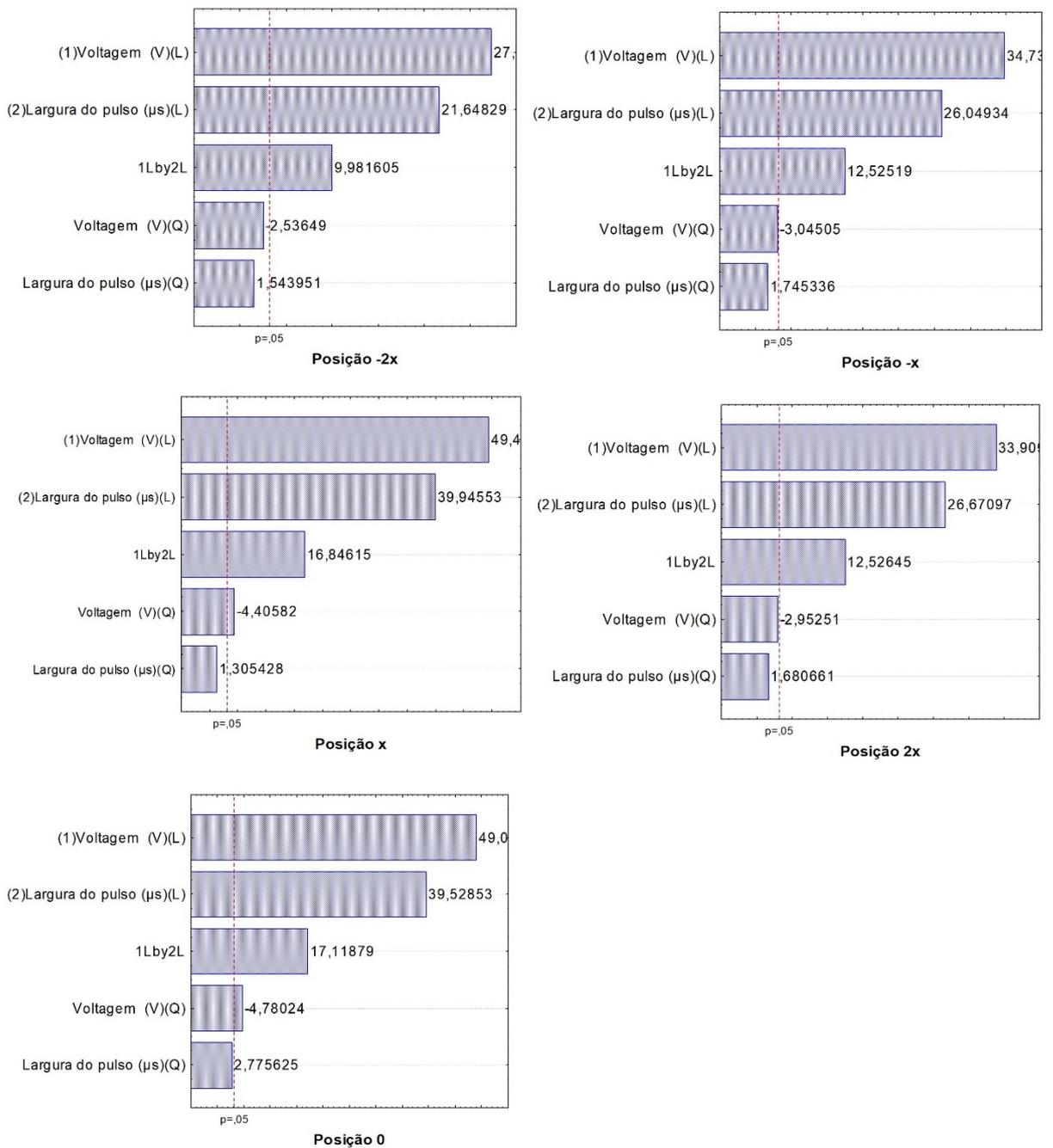
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 12 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 9,50 cm.

<b>Fatores</b>						
<b>Posição</b>	<b>Voltagem Linear</b>	<b>Voltagem Quadrática</b>	<b>Largura do pulso Linear</b>	<b>Largura do pulso Quadrático</b>	<b>Voltagem * Largura do pulso Linear</b>	
<b>-2x</b>	F	746,11	6,4338	468,649	2,3838	99,6324
	p	0,0001	0,0849	0,0002	0,2203	0,0021
	R <sup>2</sup>			0,997		
	R <sup>2</sup> adj.			0,994		
<b>-x</b>	F	1206,3	9,272	678,568	3,046	156,880
	p	0,0000	0,0556	0,0001	0,1792	0,0011
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,996		
<b>0</b>	F	2406,3	22,851	1562,50	7,704	293,053
	p	0,0000	0,0174	0,0000	0,0692	0,0004
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,998		
<b>x</b>	F	2446,4	19,411	1595,645	1,704	283,793
	p	0,0000	0,0217	0,0000	0,2828	0,0004
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,998		
<b>2x</b>	F	1149,8	8,717	711,34	2,825	156,912
	p	0,0000	0,0599	0,0001	0,1914	0,0011
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,996		

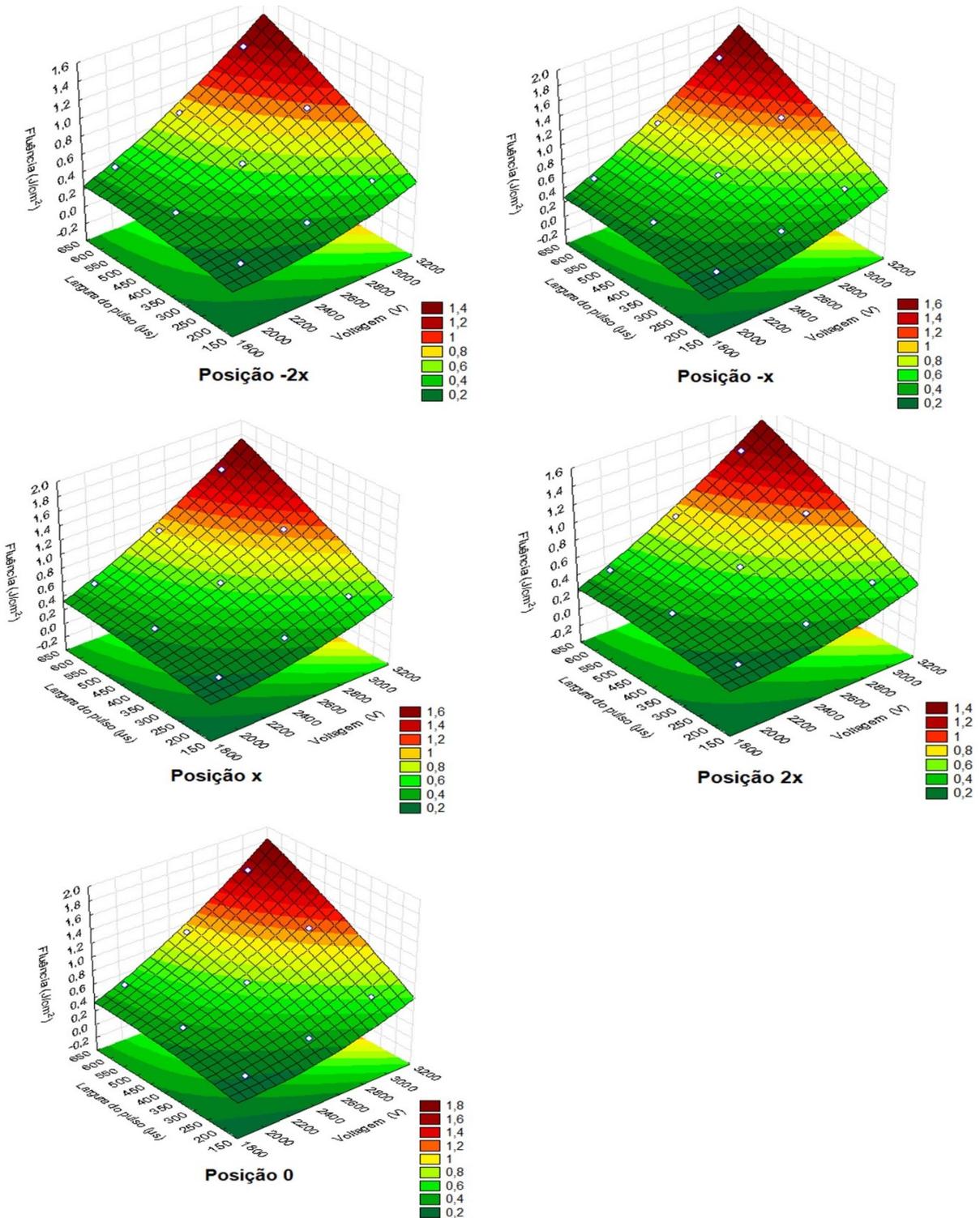
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 21- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 9,50 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da camara de luz pulsada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 22- Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulsos ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 9,50 cm, gerado a partir do planejamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 13 - Mapeamento na distância de 10,27 cm.

Ordem	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Fluências (J/cm <sup>2</sup> )				
	Voltagem	Largura do pulso	Voltagem (V)	Largura do pulso (μs)	-2x	-x	0	x	2x
<b>1</b>	-1	-1	2000	210	0,15	0,17	0,19	0,18	0,14
<b>2</b>	-1	0	2000	420	0,24	0,31	0,32	0,31	0,25
<b>3</b>	-1	1	2000	630	0,32	0,41	0,43	0,40	0,34
<b>4</b>	0	-1	2500	210	0,27	0,32	0,32	0,32	0,27
<b>5</b>	0	0	2500	420	0,47	0,56	0,58	0,56	0,45
<b>6</b>	0	1	2500	630	0,62	0,75	0,80	0,76	0,63
<b>7</b>	1	-1	3000	210	0,41	0,51	0,54	0,51	0,41
<b>8</b>	1	0	3000	420	0,75	0,92	1,00	0,93	0,75
<b>9</b>	1	1	3000	630	1,03	1,26	1,32	1,26	1,00

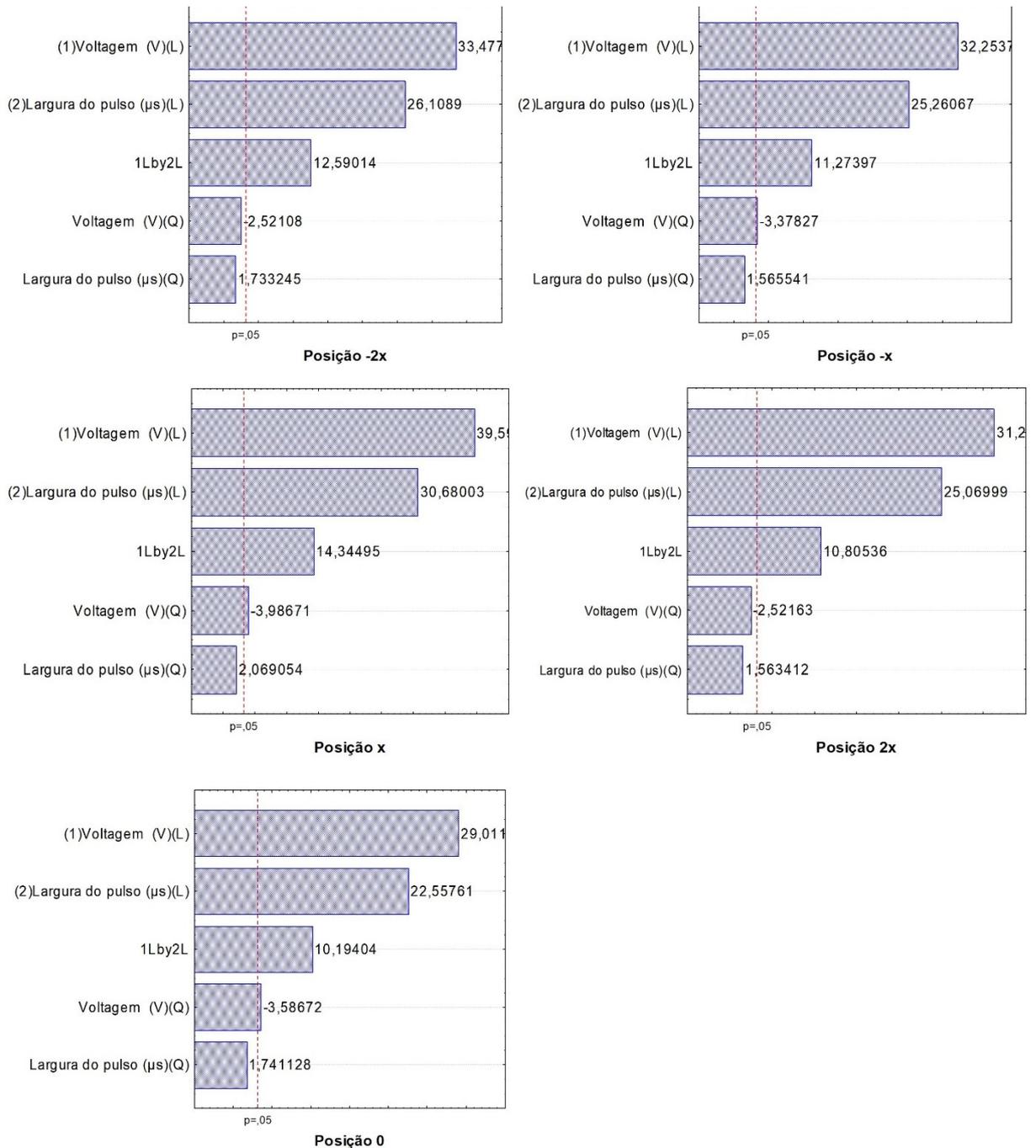
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 14 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 10,27 cm.

<b>Fatores</b>						
<b>Posição</b>	<b>Voltagem Linear</b>	<b>Voltagem Quadrática</b>	<b>Largura do pulso Linear</b>	<b>Largura do pulso Quadrático</b>	<b>Voltagem* Largura do pulso Linear</b>	
<b>-2x</b>	F	1120,7	6,356	681,674	3,004	158,512
	p	0,0000	0,0860	0,0000	0,1814	0,0010
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,995		
<b>-x</b>	F	1040,3	11,413	638,101	2,451	127,102
	p	0,0000	0,0431	0,0001	0,2154	0,0015
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,995		
<b>0</b>	F	841,65	12,846	508,845	3,0315	103,918
	p	0,0000	0,0371	0,0002	0,1800	0,0020
	R <sup>2</sup>			0,997		
	R <sup>2</sup> adj.			0,994		
<b>x</b>	F	1567,8	15,894	941,264	4,281	205,778
	p	0,0000	0,0282	0,0000	0,1303	0,0007
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,997		
<b>2x</b>	F	977,96	6,358	628,504	2,443	116,755
	p	0,0000	0,0860	0,0001	0,2159	0,0017
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,995		

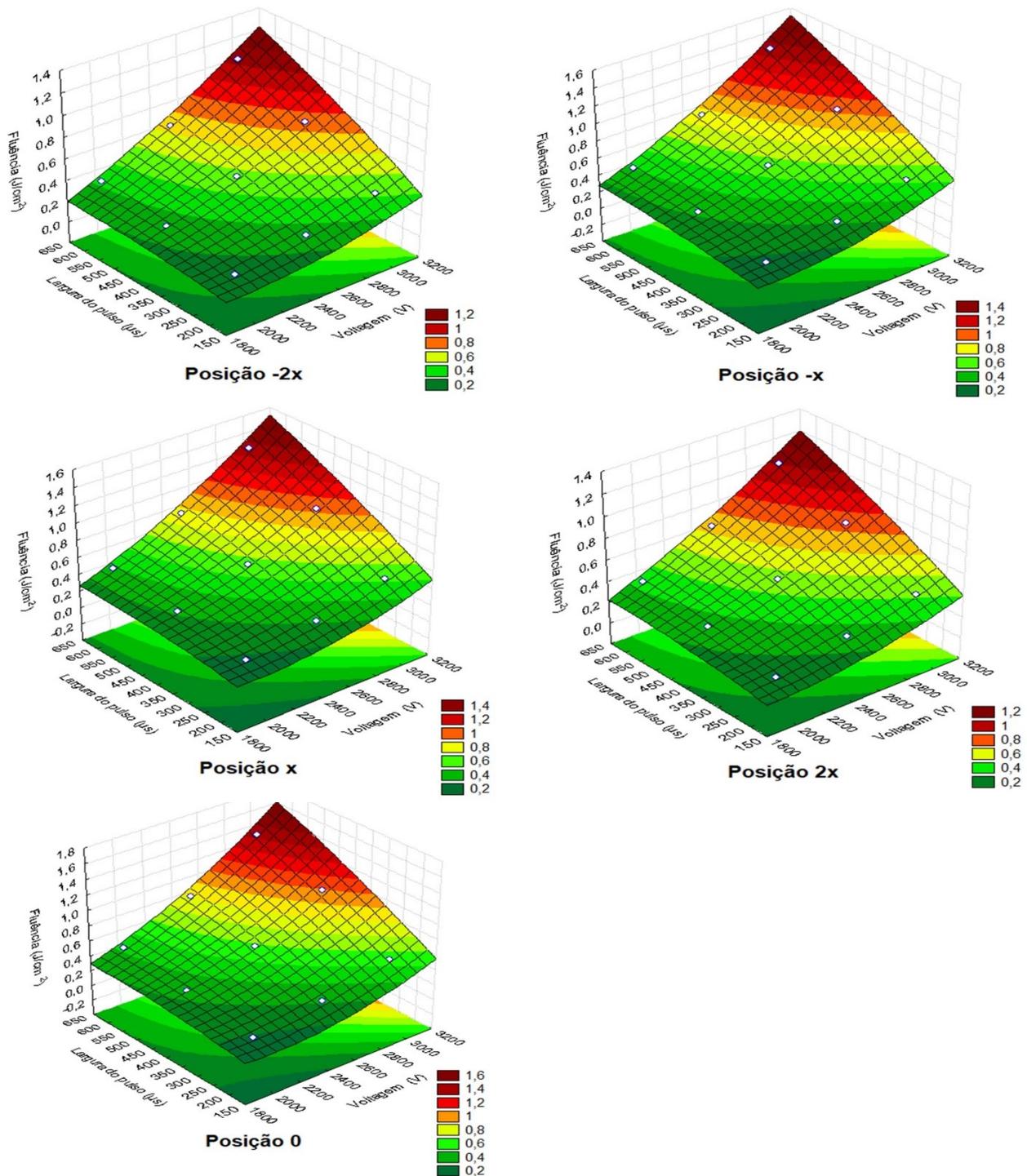
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 23- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 10,27 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da camara de luz pulsada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 24 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulso ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 10,27 cm, gerado a partir do planejamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 15 - Mapeamento na distância de 11,5 cm

Ordem	Variáveis codificadas		Variáveis reais		Fluências (J/cm <sup>2</sup> )				
	Voltagem	Largura do pulso	Voltagem (V)	Largura do pulso (μs)	-2x	-x	0	x	2x
<b>1</b>	-1	-1	2000	210	0,12	0,16	0,16	0,15	0,13
<b>2</b>	-1	0	2000	420	0,22	0,27	0,28	0,26	0,22
<b>3</b>	-1	1	2000	630	0,29	0,35	0,39	0,35	0,31
<b>4</b>	0	-1	2500	210	0,23	0,28	0,30	0,28	0,24
<b>5</b>	0	0	2500	420	0,40	0,49	0,52	0,49	0,41
<b>6</b>	0	1	2500	630	0,56	0,66	0,72	0,67	0,56
<b>7</b>	1	-1	3000	210	0,38	0,45	0,48	0,44	0,38
<b>8</b>	1	0	3000	420	0,68	0,83	0,87	0,83	0,70
<b>9</b>	1	1	3000	630	0,93	1,13	1,19	1,12	0,93

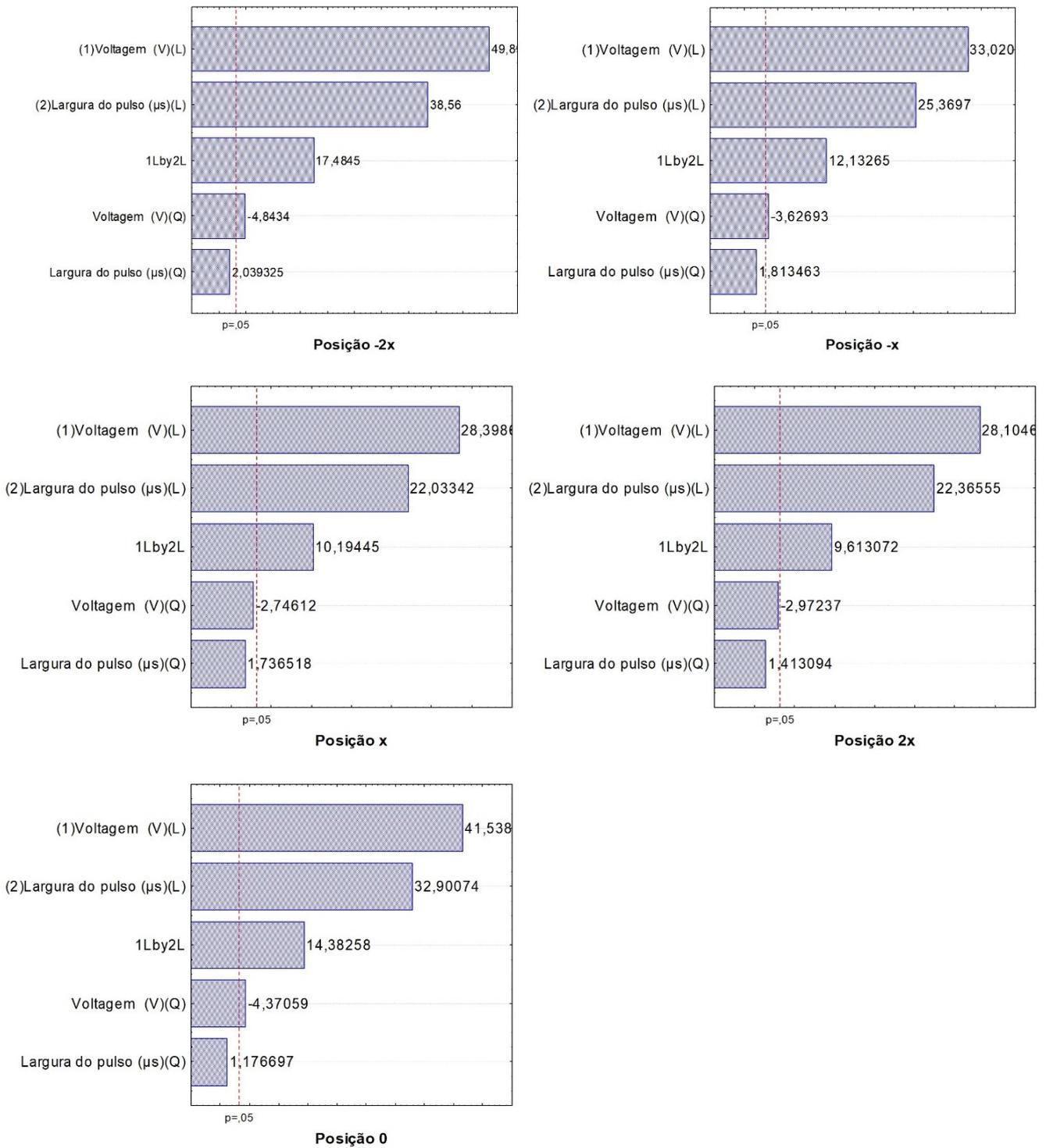
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 16 - ANOVA das equações lineares para a fluência da câmara de luz pulsada com o sensor alocado em diferentes posições verticais na distância de 11,50 cm.

<b>Fatores</b>						
<b>Posição</b>	<b>Voltagem Linear</b>	<b>Voltagem Quadrática</b>	<b>Largura do pulso Linear</b>	<b>Largura do pulso Quadrático</b>	<b>Voltagem * Largura do pulso Linear</b>	
<b>-2x</b>	F	2489,3	23,458	1486,874	4,159	305,708
	p	0,0000	0,1679	0,0000	0,1341	0,004
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,998		
<b>-x</b>	F	1090,3	13,155	643,622	3,289	147,201
	p	0,0000	0,0360	0,0001	0,1674	0,0012
	R <sup>2</sup>			0,998		
	R <sup>2</sup> adj.			0,995		
<b>0</b>	F	1725,4	19,102	1082,458	1,385	206,859
	p	0,0000	0,0221	0,0000	0,3241	0,0007
	R <sup>2</sup>			0,999		
	R <sup>2</sup> adj.			0,997		
<b>x</b>	F	806,48	7,541	485,471	3,015	103,926
	p	0,0000	0,0709	0,0002	0,1808	0,0020
	R <sup>2</sup>			0,997		
	R <sup>2</sup> adj.			0,994		
<b>2x</b>	F	789,87	8,835	500,217	1,997	92,411
	p	0,0000	0,0589	0,0002	0,2525	0,0024
	R <sup>2</sup>			0,997		
	R <sup>2</sup> adj.			0,994		

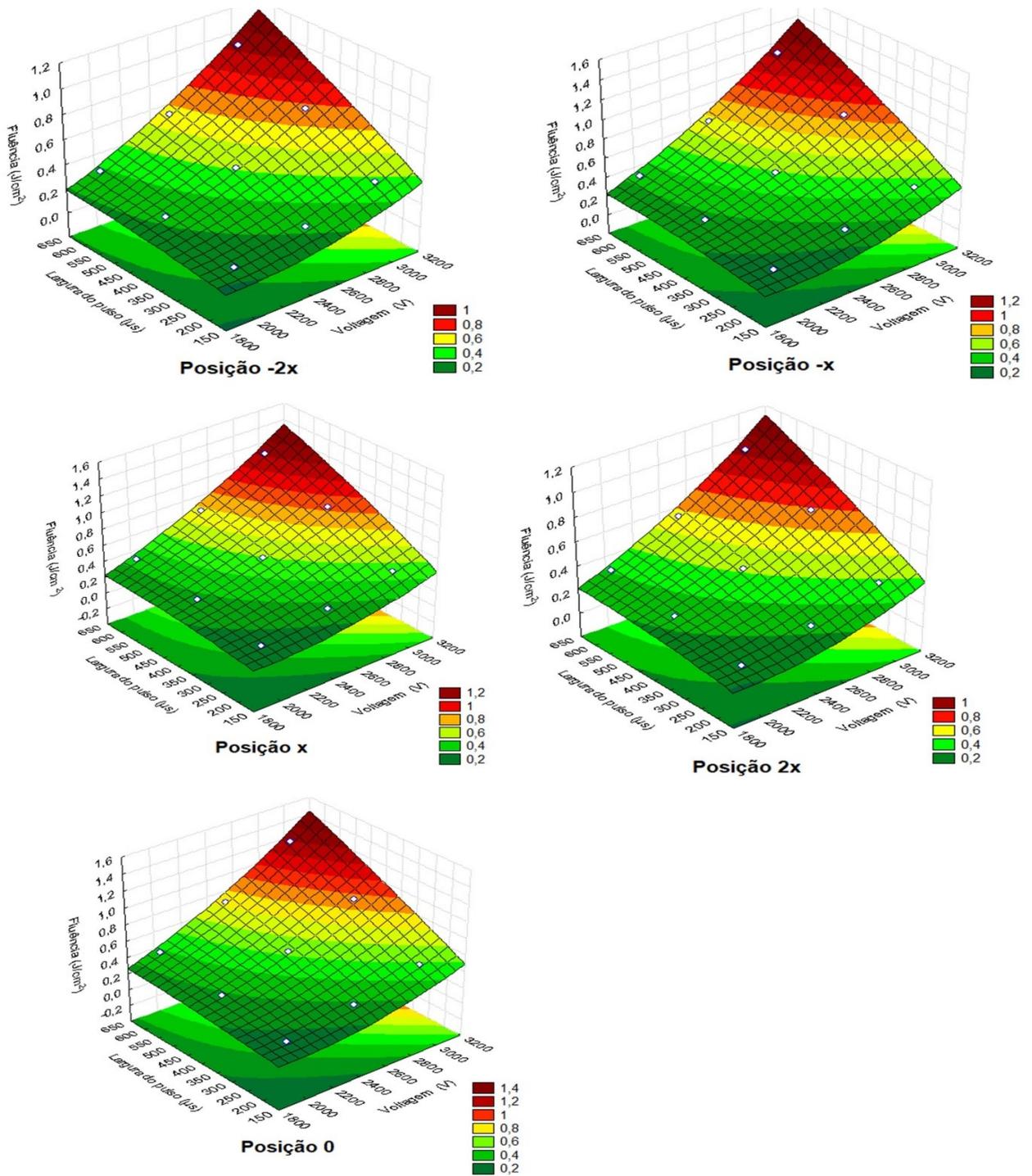
Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 25- Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos da resposta da fluência para a posições horizontais da bandeja na distância de 11,5 cm, gerado a partir do planejamento experimental para o mapeamento da câmara de luz pulsada.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 26 - Superfície de resposta com o comportamento da fluência da LP em relação à largura do pulso ( $\mu\text{s}$ ) e voltagem (V) para a posições horizontais da bandeja na distância de 11,50 cm, gerado a partir do planejamento experimental.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).