

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

APLICAÇÃO DE MODELO PREDITIVO DO COMPORTAMENTO DE
Salmonella enterica **DURANTE A ELABORAÇÃO DE SALAME DE CARNE**
SUÍNA

GABRIELA OROSCO WERLANG

PORTO ALEGRE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

APLICAÇÃO DE MODELO PREDITIVO DO COMPORTAMENTO DE
Salmonella enterica **DURANTE A ELABORAÇÃO DE SALAME DE CARNE**
SUÍNA

**Tese apresentada como requisito parcial para
a obtenção do grau de doutor em Ciências
Veterinárias, especialidade na área de
Bacteriologia**

Autora: Gabriela Orosco Werlang

**Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de Itapema
Cardoso**

Co-orientador: Dr. Eduardo de Freitas Costa

PORTO ALEGRE

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Werlang, Gabriela Orosco
APLICAÇÃO DE MODELO PREDITIVO DO COMPORTAMENTO DE
Salmonella enterica DURANTE A ELABORAÇÃO DE SALAME DE
CARNE SUÍNA / Gabriela Orosco Werlang. -- 2019.
118 f.
Orientadora: Marisa Cardoso.

Coorientador: Eduardo de Freitas Costa.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2019.

1. Salame. 2. Carne suína. 3. Salmonella. 4.
Microbiologia Preditiva. 5. Maturação. I. Cardoso,
Marisa, orient. II. Costa, Eduardo de Freitas,
coorient. III. Título.

Gabriela Orosco Werlang

**APLICAÇÃO DE MODELO PREDITIVO DO COMPORTAMENTO DE
Salmonella enterica DURANTE A ELABORAÇÃO DE SALAME DE CARNE
SUÍNA**

Prof. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

Orientadora e Presidente da Comissão

Dr. Mauro Riegert Borba

Membro da Comissão

Dra. Susana de Oliveira Elias

Membro da Comissão

Dr. Vinicius Weide Rodrigues

Membro da Comissão

*Dedico aos meus pais, Helenice e Jaime, e
minha irmã, Patricia, que sempre me apoiaram
e acreditaram na minha conquista..*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que está presente em minha vida.

Aos meus pais e minha irmã que sempre acreditaram na minha capacidade me dando suporte quando achei que não fosse conseguir.

Ao Luiz Gustavo Leal Rodrigues pela parceria, ajuda e compreensão na execução do projeto.

A minha orientadora Marisa Cardoso por me dar a oportunidade, me orientar com todo o saber científico e ser exemplo de coerência, fortaleza e justiça.

Ao meu co-orientador Eduardo de Freitas Costa por aceitar o convite, estar presente, me orientar e me ensinar a “matemática” bacteriana.

A minha colega e amiga Tatiana Regina Vieira, que idealizou o projeto comigo, sempre presente, me impulsionando nos momentos difíceis, ajudando nos momentos de trabalho e sorrindo nos momentos de alegria.

Aos pais das minhas amigas Tatiana Regina Vieira e Caroline Pissetti pela disponibilidade de equipamentos para realização do experimento.

Ao Fabrício Pedrotti, Tiago Souza da Cunha e Paula Kern pela solicitude em me ajudar nas análises para execução do projeto.

Aos meus amigos e colegas da Preventiva que me acompanharam e me ajudaram no projeto: Caroline Pissetti, Claudia Navarrete, Daniel Paim, Agnes Isadora Souza, Karoline Zanata, Gustavo Sambrano, Marisete Cerutti, Thais de Campos, Luis Gustavo Corbellini, Mauro Borba e Dona Bernardete Franco.

À equipe do Poultry Science, Universidade da Georgia, EUA: meu orientador Dr. Thippareddi, Dr. Sanjay Kumar, Mayuri Ukidwe, Mandy Howard e Angela Rincon Villegas, pela ajuda diária, ensinamentos e projetos desenvolvidos e à Fernanda Lima de Souza Castro pela parceria e amizade.

RESUMO

O salame de carne suína é um produto pronto para consumo comumente consumido no Brasil no qual a presença de *Salmonella enterica* tem sido relatada. Durante a sua elaboração, o tratamento térmico não é indicado e por isso a segurança microbiológica depende da qualidade da carne, adição de ingredientes com atividade antimicrobiana, higiene durante a produção, redução de pH e atividade de água (A_w) durante a sua maturação. Além disso, o protocolo de maturação não está determinado na legislação brasileira. Para isso, os modelos matemáticos, que geram previsões do comportamento bacteriano, podem ser utilizados para determinar protocolos de maturação eficientes. Os objetivos deste estudo foram (i) avaliar o comportamento de um coquetel de sorovares de *S. enterica* (Typhimurium, Infantis e Derby) durante o processo de maturação do salame; (ii) testar o modelo conceito gamma de acordo com Coroller *et al.* (2015) para a previsão de crescimento / inativação de *S. enterica* em um estudo Base e (iii) realizar a validação do modelo. Para isso, 50 e 21 salames foram preparados e inoculados com o coquetel de sorovares de *S. enterica* para o estudo Base e Validação, respectivamente. Os salames foram maturados em diferentes cenários: i. fermentação a 30°C e secagem a 20°C no estudo Base; ii. fermentação a 25°C e secagem a 18°C no estudo Validação. Amostras periódicas para quantificação de *S. enterica*, análises de A_w e pH foram realizadas durante a maturação e as curvas foram construídas. Os valores observados no estudo Base foram inseridos no modelo matemático e assim os parâmetros de crescimento / inativação (μ_{opt} , δ_1 , δ_2 , α) foram ajustados. Posteriormente, os parâmetros obtidos no estudo Base ($\mu_{opt} = 2,54558$, $\delta_1 = 1588,06$, $\delta_2 = 163299,72$ e $\alpha = 0,02158$) foram aplicados na validação do modelo. As curvas observadas no estudo Base mostraram que a população de *S. enterica* aumentou 1,23 log UFC.g⁻¹ nas primeiras 21 horas e diminuiu 4,95 log UFC.g⁻¹ após 920 horas de maturação. No estudo Validação, observou-se um aumento de 0,54 log UFC.g⁻¹ nas primeiras 26 horas, seguido de uma inativação de 5,55 log UFC.g⁻¹ após 1095,5 horas de maturação. O valor da A_w representou o limiar na interface de crescimento / inativação; e a inativação bacteriana começou em A_w 0,951. A regressão linear dos valores previstos em comparação aos valores observados mostrou que 97,65% e 95% da variação nos valores observados foram explicados pelos previstos no estudo Base e Validação, respectivamente. Em conclusão, o modelo aplicado mostrou ser capaz de prever o comportamento de sorovares de *S. enterica* durante a maturação do salame e, assim, poderá ser aplicado no planejamento de protocolos de fabricação de salame.

Palavras-chave: crescimento bacteriano, embutido, inativação, Gamma, modelo matemático, maturação.

ABSTRACT

Salami prepared with pork is a ready-to-eat product commonly consumed in Brazil, and previous studies reported the presence of Salmonella enterica in this product. During the manufacture at industry the heat treatment is usually not performed, therefore food safety will depend on the quality of meat, addition of ingredients with antimicrobial activity, hygiene during production, reduction of pH and water activity. In addition, fermentation and drying duration of salami is not regulated by Brazilian law. Since mathematical models generate predictions that can be used for determining efficient maturation protocols, the aims of this study were to (i) evaluate the behaviour of a S. enterica cocktail of serovars (Typhimurium, Infantis and Derby) during the maturation process of the Brazilian salami; (ii) test the suitability of the "gamma concept" model according to Coroller et al. (2015) for the prediction of growth/inactivation of S. enterica in a Baseline study and (iii) perform the validation of the model. For this, 50 and 21 salami pieces in the Baseline and Validation study, respectively, were prepared and inoculated with the cocktail of S. enterica serovars. Salami pieces were ripened at different scenarios: i. fermentation at 30°C and drying at 20°C in the Baseline study; ii. fermentation at 25°C and drying at 18°C in the Validation study. Periodical samplings for S. enterica quantification, water activity and pH analyses were performed during maturation and curves were constructed. Observed values in the Baseline study were inserted in the mathematical "gamma concept" model that adjusted growth/inactivation parameters (μ_{opt} , $\delta 1$, $\delta 2$, α). Afterwards the parameters obtained in the Baseline study ($\mu_{opt} = 2,54558$, $\delta 1 = 1588,06$, $\delta 2 = 163299,72$ e $\alpha = 0,02158$) were applied in the validation of the model. Observed curves in Baseline study showed that S. enterica population increased $1.23 \log \text{cfu.g}^{-1}$ in the first 21 hours and decreased $4.95 \log \text{cfu.g}^{-1}$ after 920 hours of maturation. In the Validation study an increase of $0.54 \log \text{cfu.g}^{-1}$ in the first 26 hours was observed followed by a $5.55 \log \text{cfu.g}^{-1}$ inactivation after 1095,5 hours of maturation. Water activity value represented the threshold in the growth/inactivation interface; and bacterial inactivation started at water activity 0.951. Linear regression of predicted values compared to the observed values showed that 97.65% and 95% of the variation in the observed values could be explained by the predicted ones in the Baseline and Validation study, respectively. In conclusion, the applied model showed to be able to predict the behaviour of Salmonella enterica serovars during the maturation process of salami, and thus the model can be applied in planning of salami manufacture protocols.

Keywords: bacterial growth, inactivation, Gamma, mathematical model, maturation, sausage

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fluxograma da produção de salames.....	29
Figura 2-	Salames recém-embutidos, identificados por etiquetas.....	55
Figura 3-	Câmara de maturação fechada.....	55
Figura 4-	Compartimento interno da câmara de maturação, dividido em área A e B, com varas de aço inox já com a posição identificada dos salames a serem pendurados, conforme definido por sorteio.....	55
Figura 5-	Esquema de posicionamento de salames dentro da câmara de maturação a partir de um sorteio hipotético de 45 salames contaminados identificados de 1 a 45 e seis salames não contaminados identificados de I a VI.....	55
Figura 6-	Ordem de coleta das unidades amostrais na câmara de maturação. Os numerais ordinais nos quadrados indicam a ordem de coleta dos salames contaminados dispostos nas áreas A e B. Os numerais ordinais nas esferas indicam a ordem de coleta das unidades amostrais não contaminadas. As cores indicam que salames de posição correspondente nas áreas A e B são amostrados simultaneamente.....	60
Figura 7-	Perfis de macrorrestrrição após clivagem com XbaI de cepas escolhidas para comporem o coquetel de <i>Salmonella enterica</i> a ser inoculado nos salames.....	73
Figura 8-	Média e desvio padrão das análises de atividade de água de unidades amostrais durante 1224 horas de maturação no estudo Piloto.....	75
Figura 9-	Média de quantificação de <i>Salmonella enterica</i> em unidades amostrais contaminadas da hora zero até 206 horas de maturação no estudo Piloto.....	76
Figura 10-	Média de quantificação de <i>Salmonella enterica</i> em unidades amostrais contaminadas das áreas A e B, da hora 206 até 1238 horas de maturação no estudo Piloto.....	77
Figura 11-	Média e desvio padrão do pH das unidades amostrais em 23 colheitas de amostras durante 941 horas de maturação do salame no estudo Base.....	78

Figura 12-	Média e desvio padrão de atividade de água das unidades amostrais em quatro pontos de amostragem durante 840 horas de maturação do salame no estudo Base.....	78
Figura 13-	Média e desvio padrão da perda de peso das unidades amostrais em 23 colheitas de amostra durante 941 horas de maturação do salame no estudo Base.....	80
Figura 14-	Média de quantificação de <i>Salmonella enterica</i> em unidades amostrais contaminadas, durante 941 horas de maturação do salame no estudo Base, a partir da inferência Bayesiana.....	81
Figura 15-	Valores das variáveis ambientais ($\gamma_{i,j}$) e ξ no crescimento de <i>Salmonella enterica</i>	82
Figura 16-	Curva do comportamento de <i>Salmonella enterica</i> observada no estudo Base e a curva predita pelo modelo matemático aplicado...	83
Figura 17-	Gráfico de dispersão e equação da reta dos valores de crescimento e inativação de <i>Salmonella enterica</i> observados no estudo Base comparado aos valores preditos.....	84
Figura 18-	Média e desvio padrão do pH das unidades amostrais em 21 pontos de amostragem durante 1121,5 horas de maturação no estudo Validação.....	85
Figura 19-	Média e desvio padrão da atividade de água das unidades amostrais em seis colheitas de amostra durante 912 horas de maturação do salame no estudo Validação.....	85
Figura 20-	Média da perda de peso das unidades amostrais em 17 colheitas de amostra durante 1121,5 horas de maturação do salame no estudo Validação.....	86
Figura 21-	Média de concentração de <i>Salmonella enterica</i> em unidades amostrais contaminadas, durante 1121,5 horas de maturação do salame no estudo Validação, a partir da inferência Bayesiana.....	87
Figura 22-	Curva do comportamento de <i>Salmonella enterica</i> observada no estudo Validação e a curva predita pelo modelo matemático aplicado.....	88
Figura 23-	Gráfico de dispersão e equação da reta dos valores de crescimento e inativação de <i>Salmonella enterica</i> observados no estudo	

Validação comparado aos valores preditos pelo modelo matemático..... 89

Figura 24- Curva do comportamento de *Salmonella enterica* observada utilizando o parâmetro de concentração inicial como incerteza..... 90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Lista de ingredientes e quantidades utilizadas para o preparo de aproximadamente 1000 g de massa de salame	53
Quadro 2 -	Parâmetros ambientais e seus valores cardinais de crescimento de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium determinados segundo Coroller <i>et al.</i> (2015)	65
Quadro 3-	Parâmetros ambientais e seus respectivos valores cardinais de inativação de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium determinados segundo Coroller <i>et al.</i> (2015)	69
Quadro 4-	Intervalo de amostragem em relação ao tempo de maturação do salame e número de unidades amostrais a ser colhido para quantificação de <i>Salmonella enterica</i> e para análise de atividade de água	78

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Distribuição de probabilidades da concentração inicial de *Salmonella enterica* em salames. 70
- Tabela 2-** Enumeração após cultivo (37°C/24 h) em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) pH 5 de 32 cepas de *Salmonella enterica* pertencentes à bacterioteca do Setor de Medicina Veterinária Preventiva, testadas em *mix* de quatro cepas e individualmente 72

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Gênero <i>Salmonella</i>	19
2.1.1	Sorovares mais relevantes na cadeia de carne suína e saúde pública	20
2.1.2	<i>Salmonella enterica</i> na cadeia de carne suína.....	22
2.1.3	<i>Salmonella enterica</i> em condições de estresse	23
2.1.4	Resposta ao estresse ácido	23
2.1.5	Resposta adaptativa ao estresse osmótico	26
2.1.6	Proteção cruzada em condições de estresse	27
2.2	Salame	27
2.2.1	Etapas da produção de salame	29
2.2.2	Ingredientes adicionados à massa de salame	30
2.2.3	Embutimento	34
2.2.4	Defumação	34
2.2.5	Maturação	35
2.3	Microbiologia preditiva	38
2.3.1	Desenho experimental de um estudo.....	39
2.3.2	Estimação da concentração de células bacterianas.....	40
2.3.3	Modelos preditivos e classificações	41
2.3.4	Modelos matemáticos desenvolvidos e descritos na literatura.....	43
2.3.5	A utilização de meios artificiais em microbiologia preditiva	44
2.3.6	Modelos matemáticos aplicados em produtos embutidos maturados	45
2.3.7	Validação do modelo matemático	46
3	PROBLEMA DE PESQUISA	47
4	HIPÓTESE DE PESQUISA	48

5	OBJETIVOS	49
5.1	Geral	49
5.2	Específico	49
6	METODOLOGIA	50
6.1	Delineamento do estudo.....	50
6.2	Escolha de cepas provenientes da bacterioteca do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva- UFRGS para comporem o coquetel de sorovares de <i>Salmonella enterica</i>.....	50
6.2.1	Teste de desempenho	50
6.2.2	Determinação do perfil de macrorrestrição das cepas de <i>Salmonella enterica</i> para formação do coquetel	51
6.3	Preparo do coquetel de <i>Salmonella enterica</i> para adição na massa do salame	52
6.4	Elaboração do salame	52
6.4.1	Formulação da massa carne.....	52
6.4.2	Preparo da cultura <i>starter</i> adicionada à massa do salame.....	53
6.4.3	Preparação da massa do salame	53
6.4.4	Adição de líquidos à massa.....	54
6.4.5	Embutimento	54
6.4.6	Identificação dos salames preparados	55
6.4.7	Câmara de maturação utilizada e pendura dos salames	55
6.5	Protocolo de maturação	57
6.5.1	Estudo Piloto	57
6.5.2	Estudo Base	58
6.5.3	Estudo Validação	58
6.6	Coleta de amostras	59
6.7	Análises microbiológica e físico-químicas	60
6.7.1	Quantificação de <i>Salmonella enterica</i> em unidades amostrais de salame.	60

6.7.2	Análises físico-químicas	61
6.8	Medidas de biossegurança adotadas durante o estudo	62
6.9	Análise estatística	63
6.9.1	Comparação do desempenho dos meios de cultura XLD e TAL para quantificação de <i>Salmonella enterica</i> durante a maturação de salames ..	63
6.9.2	Concentração de <i>Salmonella enterica</i> por inferência Bayesiana	63
6.9.3	Estimação dos parâmetros e das variáveis ambientais	64
6.10	Modelagem matemática	64
6.10.1	Definição do modelo matemático	64
6.10.2	Dinâmica de crescimento e inativação bacteriana	65
6.10.3	Ajuste do modelo e intervalos de confiança	69
6.10.4	Validação do modelo matemático	70
6.10.5	Aplicação do modelo em um típico cenário brasileiro	70
7	RESULTADOS	71
7.1	Crescimento em pH 5 de <i>Salmonella enterica</i> sorovares Derby, Infantis e Typhimurium	71
7.2	Estudo Piloto	74
7.3	Estudo Base	78
7.3.1	Interface de crescimento e inativação de <i>Salmonella enterica</i> durante a maturação do salame	81
7.3.2	Estimação dos parâmetros e ajuste do modelo	82
7.4	Estudo Validação	84
7.4.1	Ajuste e validação do modelo	87
7.5	Aplicação do modelo em uma situação de incerteza na concentração inicial (logUFC.g⁻¹) de <i>Salmonella enterica</i>	89
7.6	Análise dos perfis de macrorrestrição de <i>Salmonella enterica</i> encontrados nos salames ao final da maturação dos estudos Base e Validação	90

8	DISCUSSÃO	91
9	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A	113
	APÊNDICE B	115
	APÊNDICE C	116

1 INTRODUÇÃO

O salame, produto cárneo embutido, é consumido por parcela significativa da população brasileira e representa 2% do total de produtos de origem suína comercializados no país (PELTIER, 2010). No Brasil, este produto deve ser elaborado, obrigatoriamente, com carne suína ou suína e bovina, submetido à cura e maturação, processo dividido em fermentação e secagem (BRASIL 2000). O tratamento térmico da matéria-prima utilizada ou do produto já embutido não é permitido, o que alerta para um risco de sobrevivência de bactérias causadoras de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no produto final.

Considerando o tradicional consumo de salame no Brasil, é importante que esse produto esteja livre de bactérias patogênicas ao consumidor. Sua inocuidade depende da qualidade da matéria prima inicial e de fatores como ingredientes antimicrobianos adicionados na cura, redução de pH e A_w , consequências dos processos de fermentação e secagem, respectivamente; aliados aos fatores extrínsecos como temperatura e Umidade Relativa (UR) da sala de maturação e duração do processo. Além disso, o salame é um produto classificado como *Ready-To-Eat* (RTE), ou seja, é um alimento que pode ser consumido sem a adição de qualquer tratamento após sua aquisição no varejo (EUA, 2001). Dessa forma, a preocupação com a contaminação por patógenos durante o seu processamento na indústria é ainda maior, já que esses produtos serão potencialmente consumidos sem posterior etapa de redução microbiana.

No Brasil, apesar da elaboração do salame dever estar de acordo com as normas de elaboração, não há uma formulação obrigatória determinada. Assim, os ingredientes opcionais e tempo de execução das etapas de fermentação e secagem ficam a critério do elaborador, desde que, ao final, o produto apresente valores máximos permitidos de umidade e A_w determinados na legislação brasileira (40% e 0,90, respectivamente) com o propósito de criar barreiras suficientes contra os micro-organismos (BRASIL, 2000). No entanto, existem produtos no varejo que não estão conformes com essa obrigatoriedade (CACCIOPOLLI *et al.*, 2006). Além disso, o valor do pH, ponto crucial como base para o início do controle microbiológico e do processo, não está estabelecido na legislação brasileira como critério de controle obrigatório, permitindo uma variação de acidez nesses produtos e, conseqüentemente, parâmetros de A_w alterados.

Além dos padrões técnicos de identidade e de qualidade, padrões microbiológicos são determinados pela Agência Nacional de Vigilância em Saúde (ANVISA) para o salame. Parâmetros limites para coliformes a 45°C (até 1×10^3 UFC. g⁻¹) e *Staphylococcus* spp. coagulase positiva (até 5×10^3 UFC.g⁻¹) estão estabelecidos, bem como a exigência de ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de alimento (BRASIL, 2001).

Os coliformes a 45°C e *Staphylococcus* spp. coagulase positiva são considerados micro-organismos indicadores que demonstram o nível de contaminação, indicando falha do processo. Para ambos os grupos a enumeração fornece informações da falta de higiene no processamento, o que pode ser acompanhado de risco de presença de patógenos (SILVA *et al.*, 2010). No caso de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva, seu controle também é estabelecido por ser causador de DTA, pois quando está em contagens acima de 10^5 UFC.g⁻¹ pode produzir enterotoxinas no alimento (SPERBER, 1983; FORSYTHE; HAYES, 1998; ZOCHE *et al.*, 2011).

Dentre as bactérias causadoras de DTA, *Salmonella enterica* tem ausência exigida porque é uma preocupação mundial devido ao elevado número de casos e a diversidade de alimentos potencialmente veiculadores desse patógeno. No Brasil, entre 2009 a 2018, *S. enterica* foi a segunda maior causa entre as bactérias causadoras de surtos alimentares, apresentando 11,3% de incidência nos casos confirmados laboratorialmente, frequência muito provavelmente subestimada (BRASIL, 2019). Dentre os produtos de origem animal, que estão implicados em casos de salmonelose, a carne suína, que é a principal matéria prima na elaboração do salame, figura como uma das mais importantes carreadoras desse patógeno em diversos países (ARGUELLO, 2013; ANDINO; HANNING, 2015).

A subnotificação de casos de DTA, no Brasil, dificulta a identificação de salames como fonte de surtos. Registros no SIRVETA, em 2000 (INNPAZ OPS/OMS 2002), demonstram a ocorrência de um surto no Brasil relacionado a salame contaminado com *Salmonella*. Além disso, Zocche *et al.* (2011) e Peter *et al.* (2012) demonstraram que houve isolamento de *S. enterica* em 5,9% e 4,4% dos salames coletados nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente. Em um panorama mundial, investigações epidemiológicas em surtos ocorridos em diferentes países associaram os casos de salmonelose ao consumo de salames curados: *Salmonella* Typhimurium na Inglaterra (COWDEN *et al.*, 1989) e na Itália (PONTELLO *et al.*, 1998) e *Salmonella* Montevideo nos EUA (JULIAN, 2010). No surto ocorrido na Itália, Pontello *et al.* (1998) identificaram que o período insuficiente de maturação permitiu a sobrevivência de

Salmonella Typhimurium nos salames. Por outro lado, estudos determinaram que, mesmo realizando a produção do salame com tempo de maturação suficiente, *Salmonella enterica* conseguiu sobreviver às barreiras impostas pelo processamento do alimento (NITHINGALE *et al.*, 2006). Dessa forma, observa-se a necessidade de estimar os parâmetros ideais que possam descrever o comportamento do patógeno no salame brasileiro. Além disso, acredita-se que as bactérias apresentem um comportamento distinto em diferentes alimentos e que desenvolvam mecanismos celulares de adaptação aos estresses ambientais (BEALES, 2004; GOUNADAKI, 2007; NITHINGALE, 2006; ÁLVAREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2012). Portanto, novas abordagens devem ser adotadas no estudo do crescimento bacteriano em salames com o objetivo de estabelecer parâmetros referenciais de controle do processo.

Nas duas últimas décadas, a modelagem com auxílio da microbiologia preditiva, programas computacionais e modelos de avaliação de risco, ganhou especial atenção na indústria de carnes, pois é um recurso para estimar quantitativamente a segurança dos alimentos (CEPEDA *et al.*, 2013). Para isso, é necessária uma maior compreensão da fisiologia e do comportamento microbiano frente aos fatores que controlam o crescimento (temperatura, pH e A_w) em alimentos complexos tais como o salame (MCMEEKIN *et al.*, 1997). Assim, modelos multifatoriais podem ser utilizados como ferramentas de estudos microbiológicos na indústria de alimentos como estratégias para reduzir o risco de salmonelose, a partir da identificação dos componentes mais e menos significativos para a sobrevivência do micro-organismo.

Apesar de pesquisas de interações entre características como pH, ingredientes de cura, A_w e microflora inicial indicarem que a determinação de parâmetros de processamento possam ser benéficos para o controle de patógenos nos alimentos (DUFFY; WHITING; SHERIDAN, 1999; JUNEJA *et al.*, 2014), no Brasil, raros são os estudos específicos de inativação de *S. enterica* em salames utilizando microbiologia preditiva. Diante do exposto, o presente estudo visa determinar o comportamento de *S. enterica* durante as etapas de elaboração de salame, utilizando a microbiologia preditiva, por meio da aplicação de um modelo matemático e realização de sua validação no alimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Salmonella*

Salmonella sp. é considerada uma das causas mais importantes de gastroenterites e Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no mundo (HENDRIKSEN *et al.*, 2011). Esse gênero, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, subdivide-se em *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* subdivide-se em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. O gênero *Salmonella* também é classificado em sorovares, com base no esquema de Kaufmann White, publicado em 1934. Dentre os mais de 2.600 sorovares já identificados, cerca de 1.547 são pertencentes ao grupo *S. enterica* subsp. *enterica*. Essa subespécie é a mais importante, englobando 99% dos isolados identificados em humanos e animais de sangue quente (GUIBOURDENCHE *et al.*, 2010; STEVENS *et al.*, 2009). *Salmonella enterica* pode ser epidemiologicamente dividida em três grupos. O primeiro infecta somente seres humanos: *S. Typhi* e *S. Paratyphi*. O segundo grupo inclui sorovares adaptados a determinados hospedeiros, alguns dos quais podem ser patogênicos para humanos: *S. Gallinarum* (aves), *S. Dublin* (bovinos), *S. Abortus-equi* (equinos), *S. Abortus-ovis* (ovinos), e *S. Choleraesuis* (suínos). No terceiro grupo estão os sorovares não-adaptados, ou seja, sem preferência de hospedeiro, patogênicos para os seres humanos e outros animais e principais causadores de DTA (JAY, 2000).

Nos alimentos, *S. enterica* pode multiplicar-se entre pH 4 a 9, Aw superior a 0,94, tolerando temperaturas de 8 a 45°C (SILVA; GIBBS, 2012). Quando ingerida por seres humanos pode causar infecção caracterizada por febre, náusea, vômito, cólica e diarreia. O período de incubação varia de 4 a 72 horas após ingestão de água ou alimento contaminado. Indivíduos imunocomprometidos podem sofrer uma infecção mais prolongada que pode causar septicemia e levar a óbito (CHEN *et al.*, 2013).

No Brasil, *S. enterica* figura em segundo lugar como a bactéria mais relacionada a surtos, atrás somente de *Escherichia coli* (BRASIL, 2019). Até mesmo em países desenvolvidos, é uma das maiores preocupações em termos de saúde pública. Nos EUA, em 2016, foi líder em causas de surtos; enquanto, na Europa, ranqueou em segundo lugar, perdendo somente para *Campylobacter jejuni* (EFSA, 2016; CDC, 2016). Dentre os surtos ocorridos no Brasil, produtos de origem animal são os principais veículos de *S.*

enterica. Destes, a carne suína e seus derivados estão entre as maiores fontes de infecções humanas, chegando a 2% de incidência entre os surtos de 2009 a 2018 (BRASIL, 2019).

2.1.1 Sorovares mais relevantes na cadeia de carne suína e saúde pública

A maioria das infecções humanas é causada por um número limitado de sorovares de *S. enterica* (JONES *et al.*, 2008). A prevalência de sorovares está relacionada com o animal de produção, tipo de alimento e regiões geográficas de ocorrência da bactéria. Em relação à cadeia da carne suína, especificamente, *S. Typhimurium*, *S. Derby* e *S. Infantis* são sorovares que se destacam pela prevalência e como causa de infecções humanas (JONES *et al.*, 2008; HEINDRIKSEN *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ *et al.*, 2016; SCHROEDER *et al.*, 2016; BONARDI, 2017; SCIENTIFIC..., 2017).

Os sorovares mais comuns reportados em casos humanos confirmados na União Europeia foram *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, nos quais *S. Enteritidis* foi mais associada ao consumo de carne de frango; enquanto que *S. Typhimurium* foi mais associada ao consumo de carne suína e bovina (SCIENTIFIC..., 2017). Se analisarmos as prevalências dos sorovares presentes nos suínos, *S. Typhimurium* costuma liderar entre os sorovares mais encontrados, o que parece explicar o fato de ser o sorovar mais envolvido em surtos associados a produtos de origem suína. Outro sorovar importante é *S. Derby*, que está frequentemente presente, liderando a prevalência com *S. Typhimurium* em diferentes regiões do mundo (KRANKER *et al.*, 2003; BESSA; COSTA; CARDOSO, 2004; SILVA *et al.*, 2006; KICH *et al.*, 2011; VISSCHER *et al.*, 2011; DENIS *et al.*, 2013; BONARDI, 2017).

Embora seja difícil a correlação da presença de sorovares encontrados nos suínos com os produtos cárneos industrializados; no Brasil, pesquisas em abatedouros na região sul do país concordam que *S. Typhimurium* e *S. Derby* são prevalentes durante o processamento, sendo encontrados desde os animais e suas fezes no pré-abate e, também, ao final do processamento, nas carcaças ou até mesmo na massa para produção de embutidos (CASTAGNA *et al.*, 2004; SCHWARZ *et al.*, 2009; KICH *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; PISSETTI *et al.*, 2012). Corroborando com esses indicativos, recentemente, a análise em produtos industrializados demonstrou que *S. Typhimurium* (46%) e *S. Derby* (20%) foram os sorovares mais comuns encontrados em embutidos de carne suína na cidade de São Paulo (RISTORI *et al.*, 2017). No estado do Rio Grande do Sul 4,4% de salames analisados estavam contaminados com *S. Typhimurium* (PETER *et al.*, 2012).

Esses resultados sustentam a hipótese de que *S. Typhimurium* e *S. Derby* estão entre os sorovares mais importantes, quando considerado produtos de origem suína no Brasil. Além disso, no contexto mundial, ambos sorovares já foram associados a surtos após o consumo de salames e produtos semelhantes de origem suína na Inglaterra (COWDEN *et al.*, 1989), na Itália (PONTELLO *et al.*, 1998) e na Espanha (ARNEDO-PENA *et al.*, 2016).

Salmonella *Infantis* é mundialmente reconhecida como um sorovar emergente. Está amplamente distribuída em todos os continentes e, frequentemente, associada a surtos em países desenvolvidos (HENDRIKSEN *et al.*, 2011; SCIENTIFIC..., 2015). Segundo Scientific... (2017), é o quarto sorovar mais associado a infecções em humanos e é um patógeno importante em saúde pública, pois apresenta multirresistência a diferentes drogas. Autores sugerem que a rápida emergência de *S. Infantis*, em alguns surtos, tenha sido facilitada pela presença de um plasmídeo que confere resistência a múltiplas drogas, metais pesados, desinfetantes e patogenicidade em isolados considerados clonais (AVIV *et al.*, 2014). Em Israel, durante sete anos, *S. Infantis* foi o sorovar predominante, responsável por 30% dos casos humanos de salmonelose (GAL-MOR *et al.*, 2010; AVIV *et al.*, 2014). Na Alemanha, a investigação de um surto prolongado (durante seis meses), associado com carne moída suína, confirmou a presença da uma mesma cepa de *S. Infantis* em toda a cadeia da carne, desde o abatedouro de suínos até os isolados humanos, evidenciando a permanência deste sorovar durante o processamento de carnes suínas (SCHROEDER *et al.*, 2016). No Brasil, *S. Infantis* é um importante sorovar, sendo relatado em diversos estudos e em diferentes etapas da produção de carne suína: nos animais pré-abate (KICH *et al.*, 2011), nas carcaças ao final do processo de abate (KICH *et al.*, 2011; PISSETTI *et al.*, 2012) e nos embutidos crus (MÜRMAN; SANTOS; CARDOSO, 2009; RISTORI *et al.*, 2017). Além disso, pesquisas alertam para a sua capacidade de formar biofilmes em superfícies de aço inox utilizadas na indústria de alimentos, podendo causar contaminação cruzada durante os processos (WANG *et al.*, 2013). Dessa forma, *S. Infantis*, é um sorovar considerado importante na cadeia da carne suína, devido às características apresentadas e, principalmente, em relação à sua emergência como sorovar potencialmente causador de DTA em todo o mundo (GAL-MOR *et al.*, 2010; AVIV *et al.*, 2014; SCHROEDER *et al.*, 2016).

2.1.2 *Salmonella enterica* na cadeia produtiva de carne suína

A principal matéria-prima exigida para produção de salame é a carne suína (BRASIL, 2000). Analisando a cadeia produtiva dessa carne, entende-se porque alimentos de origem suína podem estar contaminados com *S. enterica* e que, em seu fluxograma de elaboração de produtos, há muitas etapas que podem alterar a prevalência desse micro-organismo da matéria-prima até o produto final (HURD *et al.*, 2001).

A granja de suínos pode ser considerada como uma das primeiras etapas nessa cadeia produtiva. Nesta, os suínos podem estar portadores assintomáticos de *S. enterica* e, quando submetidos ao estresse, esses aumentam a excreção fecal dessa bactéria. Considerando isso, o transporte da granja até o matadouro provoca um grande estresse nos portadores, causando a disseminação do patógeno entre os suínos saudáveis o que aumenta, por consequência, a presença de *S. enterica* na entrada da linha de abate no matadouro (RAJKOWSKI *et al.*, 1998; ARGUELLO *et al.*, 2013).

No matadouro, o processo de abate objetiva impedir que micro-organismos presentes nos órgãos e na pele dos animais infectados e/ou contaminados sejam transferidos para a matéria-prima produzida. Entretanto, a entrada de animais carregando *S. enterica* no início da linha de abate é a principal fonte de contaminação da carne ao final do processo (BERENDS *et al.*, 1997). Até mesmo em plantas frigoríficas com programas de controle implementados contra patógenos, carcaças positivas para *S. enterica* podem ser encontradas na câmara de resfriamento (BOLDER, 1997; HUFFMAN, 2002; KICH *et al.*, 2011; PISSETTI *et al.*, 2012; SILVA *et al.* 2012). Além disso, etapas posteriores ao fluxograma de abate, como fracionamento da carcaça e moagem da carne, aumentam o risco de contaminação por *S. enterica*, seja por contato com os equipamentos contaminados ou por contato com outras porções contendo o micro-organismo (GONZALES-BARRON; REDMOND; BUTLER, 2012; MÜLLER *et al.*, 2012).

Salmonella enterica pode estar presente na matéria-prima utilizada para a produção do salame. Considerando isso, a sua eliminação dependerá totalmente do processo de maturação do salame, pois não há tratamento térmico na elaboração desse produto (BRASIL, 2000). Entretanto, Zocche *et al.* (2011) e Peter *et al.* (2012) demonstraram que houve isolamento de *S. enterica* em 5,9% e 4,4% dos salames prontos para o consumo, disponíveis no varejo nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente. Essas pesquisas confirmaram que alguns produtos podem conter micro-organismos patogênicos

após o processo de maturação. Esses trabalhos corroboram com ocorrências de surtos em salames a nível mundial. A ocorrência de surtos de salmonelose relacionados ao consumo desse tipo de produto em países onde o sistema de vigilância epidemiológica é eficiente, também demonstrou que o processamento pode ser ineficiente na eliminação de *S. enterica* do produto final (LUZZI *et al.*, 2007; JULIAN, 2010; SCALTRITI *et al.*, 2015).

2.1.3 *Salmonella enterica* em condições de estresse

Salmonella enterica está frequentemente exposta a situações de estresse, seja em superfícies, no hospedeiro ou em intervenções durante o processo de inativação nos alimentos (KUDA *et al.*, 2013). As mudanças no ambiente podem causar alterações metabólicas na célula bacteriana, como redução da taxa de crescimento, extensão da fase lag, diminuição do metabolismo e morte celular, dependendo das consequências do estresse (GUAN *et al.*, 2017). Müller *et al.* (2012) submeteram 26 isolados de *S. enterica* pertencentes a diferentes sorovares à desidratação no ambiente (49% UR), observando que os isolados de *S. Infantis* e *S. Typhimurium* U292 sobreviveram por períodos mais longos (56 dias) do que as outras cepas estudadas. *Salmonella* Derby e *S. Typhimurium* DT170, no entanto, foram mais suscetíveis, não sobrevivendo à baixa umidade.

Dentre os processos utilizados na indústria de alimentos, a maturação do salame pode ser definida como um estresse bacteriano onde o micro-organismo é submetido à presença de ácido lático produzido pelas bactérias ácido-láticas e à desidratação do produto, tendo como objetivo a garantia da inocuidade do alimento (LÜCKE, 2000). Entretanto, os micro-organismos podem desenvolver estratégias e mecanismos de resistência a fim de sobreviver aos estresses ambientais (GUAN *et al.*, 2017). Nithingale *et al.* (2006) comprovaram que os processos durante a produção de salame podem não eliminar completamente *Salmonella* Typhimurium, demonstrando que esse micro-organismo pode tolerar os obstáculos impostos pela elaboração do produto.

2.1.4 Resposta ao estresse ácido

Embora existam alguns estudos em relação às respostas a condições de estresse em outros sorovares, *S. Typhimurium* é o sorovar mais estudado (ÁLVAREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2012). Os mecanismos que garantem a resposta de *S. Typhimurium* ao baixo pH são: bombas que exportam prótons, indução de enzimas capazes de elevar o pH

intracelular, indução de alterações na membrana e síntese de Proteínas de Choque Ácido (ASP sigla em inglês) (ÁLVAREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2012).

O pH no interior da célula bacteriana é mantido por bombas de sódio e de potássio que exportam prótons do citoplasma para o ambiente. Além dessas bombas, a lisina descarboxilase e arginina descarboxilase também exercem um papel importante na regulação do pH em *S. Typhimurium* (ÁLVAREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2012). Em situações de baixo pH, as enzimas lisina e arginina descarboxilase, que agem independentemente, convertem lisina e arginina no citoplasma da célula em cadaverina e agmatina, respectivamente. Essa ação consome um próton, aumentando o pH intracelular. A cadaverina e a agmatina, por sua vez, são exportadas para o exterior em troca de lisina e arginina, respectivamente (ÁLVAREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2010). Outro mecanismo de resposta é a alteração da membrana da bactéria, em resposta a sinais ambientais, com o propósito de proteção (BENEY; GERVAIS, 2001). Os ácidos fracos conseguem penetrar na membrana da célula bacteriana através da cadeia lipídica e ionizar a bactéria, acidificando o seu interior. Diferentemente, os ácidos fortes reduzem o pH externo à célula, mas não são capazes de permear a membrana celular diretamente. Assim, esses ácidos exercem seu efeito antimicrobiano através da desnaturação das enzimas presentes na superfície celular, o que aumenta a permeabilidade, resultando na entrada de prótons na célula bacteriana (BEALES, 2004). Os ácidos graxos presentes na membrana citoplasmática são responsáveis pela sua fluidez e tolerância ácida em *S. Typhimurium* (ÁLVAREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2008). Diante de um baixo pH, *S. Typhimurium* adapta sua membrana, onde ocorre uma diminuição na taxa de ácidos graxos insaturados/saturados, com o aumento de ácidos graxos cíclicos (ciclopropano) que diminuem a fluidez da membrana e controlam a penetração de moléculas indesejáveis (ÁLVAREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2012; GUAN *et al.*, 2017).

A resposta adaptativa de *S. enterica* sob condições de estresse ácido é conhecida como Resposta de Tolerância Ácida (RTA) definida pela resistência induzida ao pH letal após adaptação (crescimento) em pH moderadamente baixo (ÁLVAREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2012). A síntese de ASP's é induzida durante a RTA para prevenir e reparar os danos causados pelo estresse ácido (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001). Essas proteínas, além de causarem a RTA, são também responsáveis por outras atividades dentro da célula bacteriana e são dependentes da fase de crescimento em que o micro-organismo se encontra (BEALES; 2004). A proteína RpoS, durante a fase exponencial de crescimento de *S. enterica*, controla a expressão de mais dez ASP's que protegem a célula do estresse

ácido e outras condições de estresse. A proteína Fur está relacionada à regulação de captação do ferro, mas também à proteção da bactéria na fase exponencial contra ácidos orgânicos (FOSTER, 1993; AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001). A PhoPQ também está relacionada com a proteção durante a fase exponencial de crescimento, garantindo proteção contra ácidos inorgânicos. A OmpR /EnvZ em ambiente ácido, desencadeia a expressão de genes necessários para a fase estacionária durante a RTA (BANG *et al.*, 2000; BEALES, 2004).

Greenacre *et al.* (2003) relataram que as maiores taxas de sobrevivência em pH 3 foram apresentadas pelas cepas de *S. Typhimurium* previamente adaptadas em pH 5,5 por duas horas na presença de ácido acético e três horas na presença de ácido lático. Dessa forma, considerando que o pH durante a fermentação do salame fica próximo a 5 pela presença do ácido lático, essa fase poderia ser uma etapa de adaptação para a bactéria, caso não seja eliminada no processo. Além disso, Álvarez-Ordóñez *et al.* (2009) demonstraram que *Salmonella Typhimurium* foi mais resistente à condição ácida em extrato de carne suína acidificado do que em meio de cultura acidificado e, embora não esteja bem definido como micro-organismos se protegem de condições ácidas, os autores sugerem que a presença de aminoácidos da carne pode ser um fator importante de proteção para *S. enterica*. Esses achados sugerem que produtos à base de carne podem facilitar o desenvolvimento de células de *S. Typhimurium* adaptadas, constituindo um maior risco de salmonelose humana.

A RTA possibilita a sobrevivência de *S. enterica* em alimentos e também pode potencializar sua resistência a condições de pH extremo no estômago do hospedeiro, por isso alguns autores sugerem como um provável mecanismo de virulência. Berk *et al.* (2005) estudaram 37 cepas de *S. Typhimurium* advindas de pacientes humanos e de ambiente e descobriram que aqueles isolados provenientes de humanos demonstraram uma maior resistência ácida. Esses resultados sugerem que micro-organismos capazes de sobreviver mais ao ácido podem apresentar vantagem contra as defesas do hospedeiro (macrófagos e pH estomacal). Portanto, durante a produção de alimentos, há a preocupação se as bactérias, introduzidas durante o processamento, já estão adaptadas devido aos ácidos utilizados na indústria, apresentando RTA, sobrevivendo facilmente à maturação. Outra preocupação é que as bactérias serão adaptadas quando submetidas ao moderado pH, durante a fermentação do alimento, desenvolvendo RTA no processamento e resistindo mais facilmente às defesas do hospedeiro, quando o alimento for consumido (NITHINGALE *et al.*, 2006).

2.1.5 Resposta adaptativa ao estresse osmótico

Outro estresse conhecido é a exposição à desidratação onde a água fica indisponível para a célula bacteriana. Conseqüentemente, as células são submetidas ao estresse hiperosmótico, que inibe o crescimento microbiano, funções essenciais para a bactéria e muitos processos como transporte de nutrientes e replicação de DNA (BEALES, 2004). Coroller *et al.* (2015), estudando o comportamento de *Salmonella* sp. durante o processamento de salame francês, demonstraram que a A_w foi o principal fator limitante para o crescimento de *Salmonella* sp. no seu produto.

Micro-organismos têm desenvolvido mecanismos de ajuste hiperosmótico conhecido como osmorregulação. Acredita-se que em A_w abaixo de 0,90 muitas bactérias cessem sua atividade e que a 0,70 muitos fungos parem de crescer. Na microbiologia de alimentos, a A_w somente pode ser reduzida através da secagem dos alimentos ou através do aumento de solutos no ambiente (LABUZA, 1980).

Quando a água está reduzida no ambiente, as células perdem água para garantir a restauração do equilíbrio osmótico. Se a redução de A_w é devido ao aumento de solutos no ambiente, que estão indisponíveis para serem transportados para o interior da célula; ocorre uma perda temporária do turgor da célula, até que ela aumente seus solutos internos, resultando em um aumento da pressão osmótica. Dessa forma, solutos específicos como açúcares, alcóois e aminoácidos são acumulados para aumentar a pressão osmótica e restaurar o turgor celular (BEALES, 2004).

O balanço intracelular com solutos e sistema de transporte depende da permeabilidade da membrana. Em baixa osmolaridade, esse balanço ocorre com a síntese de oligossacarídeos derivados da membrana. Entretanto, o estresse hiperosmótico pode alterar a posição dos lipídeos dentro da camada bilipídica e também aumentar a proporção de fosfolipídeos, onde ácidos graxos são modificados, aumentando os ácidos graxos insaturados, modificando a fluidez da membrana (BEALES, 2004). Em baixo estresse osmótico, poucos solutos são acumulados e o transporte e síntese destes estão inativados. Com o aumento repentino do estresse ácido há a indução da expressão de genes que codificam enzimas para síntese de solutos e a atividade dos sistemas de transporte. A capacidade da célula em sintetizar esses solutos é limitada, então essas moléculas são importadas do ambiente para o interior da célula, através de carreadores e transportadores

ABC presentes na membrana celular. Assim, os solutos entram e são acumulados, mantendo a célula osmorregulada (GUAN *et al.*, 2017).

2.1.6 Proteção cruzada em condições de estresse

Células bacterianas que estão adaptadas em ambientes ligeiramente ácidos induzem proteção a outros estresses ambientais (LEYER; JOHNSON, 1993; AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001). Isso ocorre devido a adaptações celulares em ambientes adversos, onde a regulação de genes para o estresse primário (baixo pH) desencadeia outras respostas ao estresse posterior. Estas regulações desempenham papéis interligados ao estresse, o que pode levar a um fenômeno conhecido como proteção cruzada. Por exemplo: proteínas de membrana externa nas bactérias Gram-negativas que respondem ao estresse osmótico (OmpC e OmpF), podem ser previamente expressas quando o micro-organismo é submetido em condições levemente ácidas (LEYER; JOHNSON, 1993).

Testes em meios de cultura demonstraram a proteção cruzada: células de *S. Typhimurium*, previamente adaptadas ao ácido, aumentaram sua tolerância ao estresse osmótico (2,5M NaCl), resistindo durante 21 dias, comparado com células não adaptadas que foram eliminadas após nove dias nas mesmas condições. Esses resultados foram atribuídos à presença da proteína de membrana OmpC nas células adaptadas e que é expressada em estresses ácidos e osmóticos (LEYER; JOHNSON, 1993). Em relação ao processamento de salame, é difícil sugerir o comportamento de *S. enterica*, pois o resultado depende de inúmeros fatores: isolados de mesmo sorovar apresentam respostas diferentes a condições de estresse (BERK *et al.*, 2005; MÜLLER *et al.*, 2012); meios de cultura apresentam pH e ácidos diferentes que o alimento; tempo de adaptação ao ácido na elaboração do produto; o tempo de processamento do salame e as condições da matriz do alimento (TIGANITAS *et al.*, 2009; ÁLVAREZ-ORDOÑEZ *et al.*, 2012). Entretanto, a fermentação e posterior secagem, onde a bactéria é submetida a pH moderado e posterior estresse, sugerem uma possibilidade de proteção cruzada.

2.2 Salame

O salame brasileiro deve ser elaborado, obrigatoriamente, com carne suína (pelo menos 60%) ou suína e bovina, adicionado de toucinho, ingredientes que caracterizem o sabor, embutidos em envoltórios naturais ou artificiais sem receber tratamento térmico

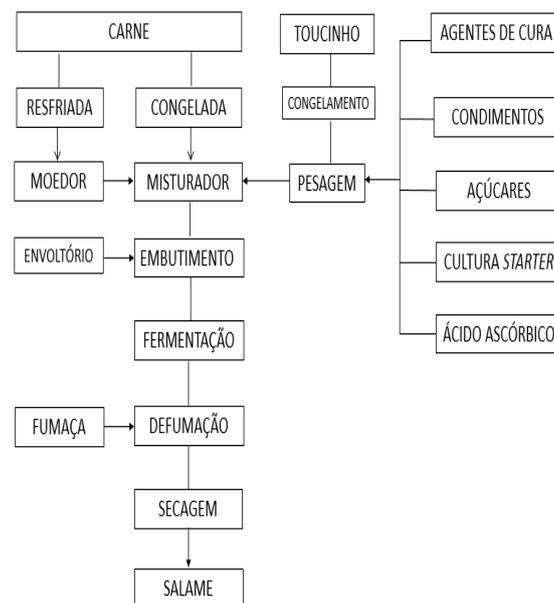
durante o seu preparo. Por isso, deve ser submetido às etapas de cura, fermentação e dessecação a fim de obter, ao final do processo, o sabor característico e segurança microbiológica. A presença de mofo na superfície externa é uma consequência natural do processo tecnológico de fabricação (BRASIL, 2000).

No Brasil, são descritos oito tipos de salame que diferem em relação à sua origem e processo de obtenção, características físico-químicas e algumas particularidades, sendo cada um descrito em um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade Individual (RTIQ) (Apêndice A) (BRASIL, 2000). Entretanto, observando as pesquisas internacionais e brasileiras, o salame italiano é o tipo mais relatado (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000; MARCHESI *et al.*, 2006; NITHINGALE *et al.*, 2006; CICHOSKI; ZIS; FRANCESCHETTO, 2009; CIROLONI *et al.*, 2010; MARANGONI; MOURA, 2011; DALLA SANTA, *et al.* 2014; SANTOS *et al.*, 2015; ROCCATO *et al.*, 2017). O salame também pode ser classificado como produto RTE que, após ser adquirido no varejo, não precisa ser submetido a tratamento adicional na casa do consumidor; portanto, é um alimento maturado que será consumido cru (EUA, 2001).

2.2.1 Etapas da produção de salame

A seguir está apresentado um fluxograma da elaboração de salame (Figura 1).

Figura 1- Fluxograma da produção de salames.



Fonte: Buckenhiiskes (1993). Adaptado.

A carne *in natura* é facilmente perecível e ideal para o crescimento microbiano devido às suas características intrínsecas: elevada A_w (0.98), pH moderado (5.5 - 6.5) e fonte disponível de carbono e outros nutrientes (HUGAS, 1998; MCDONALD; SUN, 1999). Para a produção do salame, é necessário que a carne seja de boa qualidade, que não contenha muita gordura, com baixa carga de bactérias, moída e deixada em repouso durante 24 horas a 4°C. Seu tratamento térmico é proibido, a utilização de calor nessa matéria prima inativaria as células vegetativas e esporos microbianos; no entanto, afetaria negativamente a obtenção de características sensoriais desse produto (CEPEDA *et al.*, 2013).

O toucinho picado deve ser adicionado à carne para fornecer sabor ao produto. Esse toucinho deve ser, preferencialmente, da região costal suína, porque de outras regiões a gordura pode ter o ponto de fusão inferior e não apresentar a consistência

recomendada, podendo causar defeitos de cor e sabor, devido à alta suscetibilidade à oxidação química, resultando em rancificação (BACTOFORM..., 2009). Recomenda-se trabalhar com o toucinho congelado, pois facilita o corte, evita a perda de líquido, minimiza as contaminações e mantém a temperatura da massa (ROCCO, 1996).

A cultura *starter*, os carboidratos, temperos e aditivos, que serão explicados nos itens posteriores, são misturados à carne no início do processo de mistura, enquanto que o sal, o antioxidante e o toucinho picado e congelado são adicionados por último. A posterior adição de sal garante que a carne não perca água e o toucinho picado garante que permaneça diferenciado após a mistura (BACTOFORM..., 2009).

2.2.2. Ingredientes adicionados à massa de salame

Agentes de cura

Os sais de nitrito e nitrato (de sódio ou de potássio) também conhecidos como agentes de cura podem ser adicionados juntos ou isolados à massa do salame, e devem apresentar limites máximos de concentração final: 0,03g/100g de nitrato e 0,015g/100g de nitrito (BRASIL, 1998). Pelo menos um dos sais deve ser obrigatoriamente adicionado para duas finalidades: garantir a coloração do salame e impedir o crescimento de bactérias patogênicas (BRASIL, 2000). Durante a cura, o nitrato é convertido em nitrito através de enzimas redutases produzidas por *Staphylococcus* e *Micrococcus*, permitindo a manutenção do nível de nitrito no produto por um tempo mais prolongado para a sua conservação (MARCHESI *et al.*, 2006). O nitrito cumpre quatro funções: possui efeito antimicrobiano, promove o avermelhamento da carne, garante o sabor de cura e atua como um antioxidante (HAMMES, 2012). O nitrito, em ambiente ácido (pH 5,5) na carne e sob ação de outros aditivos como o ascorbato ou eritorbato de sódio (antioxidante), é convertido em diferentes espécies de nitrogênio (HNO_2 , N_2O_3) chegando a óxido nítrico que modifica as proteínas e pigmentos da carne, fornecendo a típica coloração e sabor dos produtos curados (SKIBSTED, 2011). Em relação à inocuidade do salame, compostos derivados do nitrito, além do óxido nítrico, impedem a germinação de esporos de *Clostridium botulinum* assim como agem impedindo a respiração e o metabolismo de energia de bactérias aeróbias causando efeitos bacteriostáticos (CAMMACK *et al.*, 1999). Além disso, o nitrito participa da inibição de processos oxidativos, prevenindo a rancificação.

O Cloreto de Sódio (NaCl), adicionado à massa como sal de cura, melhora a capacidade de formar a liga entre o toucinho e a carne, devido ao aumento da solubilidade das proteínas miofibrilares (LYOCARNI..., 2013). Em concentração suficiente de sal, pode haver: a inibição do crescimento de bactérias deteriorantes da carne, pois há aumento da pressão osmótica do meio com a conseqüente redução da Aw; aumento da fase lag das bactérias ácido lácticas não interferindo na fase exponencial, mas não é capaz de eliminar bactérias patogênicas (BACTOFERM..., 2009; COROLLER *et al.*, 2015). Além disso, o sal é fundamental como potencializador de sabor e de aroma (ROCCO, 1996).

Condimentos

O alho em pó é um dos condimentos mais utilizados nas receitas brasileiras, além deste, outros ingredientes estão presentes na formulação: pimentas preta, branca e vermelha, noz-moscada, páprica, extrato de alecrim, cravo da índia e coentro. Esses condimentos muitas vezes são acrescentados ao *mix* de preparo de salame sendo adicionados desidratados (DE CARVALHO *et al.*, 2017; FIEIRA *et al.*, 2018)

Carboidratos

Vários carboidratos (glicose, sacarose, maltose, lactose) podem ser adicionados à massa do salame, já que a quantidade existente na carne é naturalmente baixa (0,08-0,1%) (BACTOFERM..., 2009). Sua adição é necessária, pois será substrato para a fermentação das bactérias ácido-láticas, adicionadas como cultura *starter*. A concentração e o tipo de açúcar estão diretamente relacionados à queda do pH. A glicose é rapidamente utilizada pelas bactérias ácido-láticas, enquanto que os outros açúcares (maltose, lactose e sacarose) são mais difíceis de serem utilizados. Isso pode ser explicado porque as enzimas envolvidas na degradação da glicose nas bactérias ácido-láticas são constitutivas, diferentemente das enzimas envolvidas no transporte e degradação dos dissacarídeos que precisam ser sintetizadas a partir da presença do carboidrato (NESTER *et al.*, 1983 *apud* STAHNKE; TJENER, 2008). Dessa forma, uma formulação com dois tipos de carboidratos pode assegurar uma rápida, porém, pequena diminuição do pH, no início da fermentação, assegurando a sobrevivência de *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp. advindos da cultura *starter* e impedindo o crescimento da microbiota indesejável (VIGNOLO; HOLGADO; OLIVER, 1989).

Culturas starters

A utilização de cultura *starter* não é obrigatória nas formulações industriais, entretanto as empresas as utilizam, pois facilita a padronização do processo. A principal função da cultura *starter* é garantir a repetibilidade e segurança, pois diante de uma microbiota nativa da carne desconhecida, a adição da cultura objetiva limitar o desenvolvimento dessa microbiota, produzir a acidificação com redução do tempo de maturação, garantir compostos característicos que conferem cor e sabor e aumentar a vida de prateleira do produto (HUGAS, 1998; BACTOFORM..., 2009). Na produção de produtos cárneos curados, costuma-se adicionar uma mistura de bactérias ácido-láticas e cocos Gram positivos como *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp. (DROSINOS *et al.*, 2005). As diversas misturas de culturas *starters* adicionadas à massa podem causar diferentes comportamentos de bactérias patogênicas, além de diferentes efeitos físico-químicos nos salames, apresentando diferentes padrões de pH, Aw e perda de peso (ROCCATO *et al.*, 2017).

As bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus* e *Pediococcus*) são responsáveis pela produção de bacteriocinas capazes de eliminar *Listeria monocytogenes*, pela competição de nutrientes com bactérias da microbiota nativa e produção de ácido orgânico (ácido lático) que causa a queda do pH. Entre esses benefícios, a queda do pH é a consequência mais importante da ação desse grupo de bactérias, pois ajuda no desencadeamento das reações de formação de cor característica, no processo de perda de água e controle de bactérias indesejadas (VIGNOLO; HOLGADO; OLIVER, 1989; LÜCKE, 2000).

A velocidade de acidificação é dada por um conjunto de fatores. Primeiramente, a caracterização do micro-organismo utilizado, pois as culturas são divididas em tradicionais e rápidas: as tradicionais (*Pediococcus pentosaceus* e *Lactobacillus curvatus*) levam mais tempo para o processamento e garantem um melhor aroma e cor, enquanto que as rápidas (*Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*) agilizam o processo, mas produzem menos aroma e cor (BACTOFORM... [20--]; LYOCARNI..., 2013). A temperatura da fermentação pode variar entre 18 a 35°C, onde temperaturas mais altas garantem uma acidificação mais rápida. Além desses fatores, o tipo de açúcar adicionado deve ser levado em consideração, pois monossacarídeos serão fermentados mais rápido que dissacarídeos; entretanto é importante verificar se a cepa utilizada fermenta o carboidrato descrito na receita. O açúcar adicionado como enchimento (aquele que a cultura *starter* não é capaz de fermentar) será substrato para as bactérias nativas, produzindo uma acidificação

descontrolada (LYOCARNI..., 2013). Além disso, a concentração de açúcar vai influenciar no crescimento das cepas ácido-láticas e, conseqüentemente, na queda do pH; por isso, a quantidade de açúcar regulará o pH final do salame (VIGNOLO; HOLGADO; OLIVER, 1989). A quantidade de sal também influencia a velocidade das culturas *starters*, pois pode aumentar a fase lag das bactérias ácido-láticas (BACTOFERM..., 2009).

Além das bactérias ácido-láticas, são adicionadas ao salame bactérias como *Staphylococcus* spp. (*S. xylosus*, *S. carnosus* e *S. simulans*) e *Kocuria varians* (*Micrococcus varians*) que são importantes redutores de nitrato e, por isso, são responsáveis pela formação de cor (GØTTERUP *et al.* 2008; HAMMES, 2012), de sabor e aroma devido à ação proteolítica e lipolítica e pela prevenção de descoloração e rancidez devido à produção de catalase (BUCKENHÜSKES, 1993; MAURIELLO *et al.*, 2004). A temperatura para o processamento do salame durante a fermentação e maturação será determinada conforme o desempenho das culturas *starters* adicionadas à massa (VIGNOLO; HOLGADO; OLIVER, 1989; DROSINOS *et al.* 2005; CULTURA..., 2013).

Aditivos

São substâncias empregadas na indústria para reduzir o tempo de cura e melhorar o aspecto e rendimento do produto.

Ascorbato, isoascorbato e eritorbato de sódio

Funcionam como aceleradores do processo de cura, contribuem para a melhoria e a estabilidade da cor e impedem a rancificação das gorduras. Para tal finalidade, são empregados em estado puro ou sob forma de misturas prontas, geralmente denominadas fixadores de cor (ROCCO, 1996). São considerados agentes antioxidantes, pois doam elétrons ao nitrito, levando à formação de compostos nitrosos que aceleram a formação de cor (IZUMI, 1989; BACTOFERM..., 2009).

Glucono Delta Lactona

Algumas receitas adicionam o aditivo Glucono Delta Lactona, que é uma forma oxidada da glicose rapidamente hidrolisada a ácido glucônico acelerando a diminuição do pH na massa, o que não é possível obter com a cultura *starter* somente. A desvantagem é a impossibilidade de controlar a microbiota nativa e, em altas quantidades, este

componente pode causar um sabor metálico e textura quebradiça ou granulada do salame (BACTOFERM..., 2009; CULTURA..., 2013).

2.2.3 Embutimento

O embutimento tem por finalidade dar forma ao produto cárneo. São permitidos envoltórios de origem natural (provenientes do intestino, bexiga, esôfago de suínos ou bovinos) ou artificial (constituídos de celulose e colágenos). As tripas de colágeno e de celulose possuem a vantagem de padronização do produto, facilidade no embutimento e baixo risco de contaminação cruzada (PARDI, 2001). O calibre do envoltório será determinado pelo tipo de salame que será elaborado (BRASIL, 2000)

Ao embutir, a massa cárnea deve estar em baixa temperatura o que previne a formação de película de gordura na parte interna do envoltório que poderia inibir o processo de secagem (CULTURA..., 2013). Por isso, após a realização da mistura de todos os ingredientes, a indústria refrigera a massa (etapa de descanso) que, posteriormente, retorna ao processo para o embutimento. O embutimento deve assegurar que não haja entrada de oxigênio no envoltório (ORDOÑEZ *et al.*, 2007). A presença de oxigênio no embutido pode resultar em pontos esverdeados no produto e aumento da rancificação de gorduras devido a processos oxidativos. Para isso, as grandes empresas realizam o embutimento a vácuo. Após o embutimento, é importante esperar algumas horas para equilibrar a temperatura do embutido com o ambiente, antes de submeter a temperaturas mais altas a fim de evitar a condensação de água no lado externo do envoltório (BACTOFERM..., 2009).

2.2.4 Defumação

A defumação é opcional na produção de salames brasileiros (BRASIL, 2000). A fumaça, produzida a partir da combustão de aparas ou serragem de madeira, promove grande quantidade de compostos ácidos, álcoois, carbonilas e fenóis, que adsorvem ou condensam na superfície dos salames (ORDOÑEZ *et al.*, 2007). É um processo realizado para conferir aroma, sabor e cor, ajudar na conservação e impedir a rancificação das gorduras superficiais (ROCCO, 1996). Atualmente, esse processo tem mais importância como agente saporizante do que um processo de conservação (BACTOFERM..., 2009). A defumação tradicional pode ser realizada a frio (20 a 25°C, 70 a 80% UR) durante

algumas horas ou vários dias, ou a quente com injeção de vapor para evitar a dessecação do produto, contudo, é cada vez mais frequente a utilização de aromas e condensados de fumaça, assim como vapores líquidos em vez da utilização de fumaça (ORDOÑEZ *et al.*, 2007). Algumas formulações que executam a defumação por 24 horas até quatro dias e em temperaturas altas, já realizam a fermentação nessa etapa (BAKA *et al.*, 2011; MARANGONI; MOURA, 2011).

2.2.5 Maturação

O processo de maturação pode ser dividido em duas etapas em sequência: (1) fermentação e (2) secagem. Sua duração é determinada conforme cada tipo de salame e, segundo Caccioppoli *et al.* (2006), pode levar de 25 a 50 dias, objetivando transformar a massa cárnea em salame, garantindo suas características físico-químicas e segurança microbiológica. A seguir essas etapas serão explicadas individualmente.

Etapa 1. Fermentação

Após o embutimento (e defumação, caso seja empregada), o salame é colocado em uma câmara climatizada para início da fermentação, etapa em que os açúcares presentes na massa são convertidos a ácido lático pelas bactérias ácido-láticas, causando queda no pH inicial da massa cárnea, limitando o crescimento de micro-organismos indesejáveis o que garantirá o desenvolvimento do sabor característico ao produto (COROLLER *et al.*, 2015). A temperatura de fermentação (mínimo 24°C e máximo 35°C) será determinada pelas espécies escolhidas na cultura *starter* e velocidade de acidificação desejada (CULTURA..., 2013) e, segundo estudos brasileiros, salames têm sido fermentados em temperaturas que variam de 18°C a 36°C (GOMIDE *et al.*, 1997; CASTRO; LUCHESE; MARTINS, 2000; CICHOSKI; ZIS; FRANCESCHETTO, 2009; CAMPAGNOL *et al.*, 2011; MARONGANI; MOURA, 2011; DALLA SANTA *et al.*, 2014). É importante que a UR da câmara de fermentação permaneça 2 a 4% abaixo do valor da A_w do salame, que nesse momento deve estar próximo a 0,96. Dessa forma, a UR deve ser alta (85-90%) para não desidratar a superfície do embutido.

É necessário o monitoramento da temperatura, pois a ação das culturas *starters* é fortemente dependente da temperatura devido às rotas metabólicas, os sistemas de regulação e ação das enzimas. Também a UR deve ser controlada, pois abaixo do indicado

pode haver a formação de uma crosta na superfície do produto (CULTURA..., 2013; BACTOFERM..., 2009; DALLA SANTA *et al.*, 2014).

A queda do pH é determinante para o término desta etapa e início da secagem, pois quando o pH se aproxima do ponto isoelétrico das proteínas miofibrilares da carne (5,3-5,5), as mesmas ficam menos carregadas eletricamente e, conseqüentemente, a água encontra-se menos ligada às proteínas. Isso facilita a migração da água para a superfície, para o início da secagem do produto (MIRALLES; FLORES; PEREZ-MARTINEZ, 1996; DALLA SANTA *et al.*, 2014). Entretanto, a legislação brasileira não requer parâmetros de pH nessa fase a fim de determinar adequadamente o término da fermentação (BRASIL, 2000). Estudos em salames brasileiros demonstram que o pH alcançado ao final desta etapa varia entre 4,95 a 5,15, levando de dois a sete dias de fermentação (CICHOSKI; ZIS; FRANCESCHETTO, 2009; CAMPAGNOL *et al.*, 2011; BERTOL *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2015).

Etapa 2. Secagem

A etapa de secagem é definida como o período onde o salame deve atingir a perda de peso e A_w ideais para garantir a segurança microbiológica. Por isso, é nessa etapa que a textura e firmeza do salame são alcançados devido à remoção de água e desnaturação de proteínas (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000).

Da mesma forma, é importante monitorar a UR e a temperatura da câmara de maturação durante a secagem; entretanto, diferentemente da fermentação, nessa fase, a UR diminui para 85% e deve baixar gradualmente. Esse valor deve ser regulado conforme a diminuição da A_w do salame, de modo que a UR da câmara seja programada para estar sempre entre 5 a 10% menor que a A_w do embutido. Assim, a água que está na superfície consegue evaporar na mesma velocidade que a movimentação da água que sai do interior do produto para a superfície, garantindo que não crie uma crosta na superfície do embutido, o que impediria a secagem do salame (ORDOÑEZ *et al.*, 2007; BACTOFERM..., 2009).

A escolha da temperatura da câmara de maturação nessa etapa pode variar. Alguns estudos brasileiros utilizaram uma redução gradual desde a fermentação de 25°C e UR de 95% até atingir, no sétimo dia, 18°C e UR de 75% e, assim, permaneceram por até 30 dias (CICHOSKI; ZIS; FRANCESCHETTO, 2009; CIROLONI *et al.*, 2010; CAMPAGNOL *et al.*, 2011; DALLA SANTA *et al.*, 2014). Entretanto, há uma grande variação nesses padrões: Castro, Luchese, Martins (2000) realizaram a maturação a 18°C, reduzindo a UR

até 60% durante 30 dias, enquanto que Marangoni e Moura (2011) utilizaram 16 a 18 °C e UR à 70% por 35 dias. Outros ainda, mativeram a mesma temperatura durante a fermentação e secagem à temperatura de 20°C por 28 dias (UR de 90 a 70%) (DE CARVALHO *et al.*, 2017).

Parâmetro pH

Observam-se em alguns estudos que, durante a secagem, o pH do salame sofre um pequeno aumento no seu valor devido à produção de amônia a partir de peptídeos, aminoácidos, aldeídos, aminas e ácidos graxos provenientes da atividade proteolítica. Pode ainda ocorrer o desenvolvimento de fungos na superfície do alimento (consequência do processo) que podem oxidar lactato causando aumento do pH (MAURIELLO *et al.*, 2004; CAMPAGNOL *et al.*, 2011; MARANGONI; MOURA, 2011; COROLLER *et al.*, 2015). O pH final do salame não é determinado na legislação e, por isso, podemos observar pH finais que variam de 4,5 até 6,09 (CIROLINI *et al.*, 2010; DALLA SANTA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2015).

Parâmetro de atividade de água (Aw)

A Aw em alimentos é descrita como a taxa de pressão de vapor de água no alimento dividida pela pressão de vapor da água pura na mesma temperatura (LABUZA, 1980). A maioria dos micro-organismos apresenta máximo crescimento entre 0,990 e 0,995 de Aw. Por isso, a redução de Aw tem um efeito drástico no crescimento bacteriano, aumentando a fase lag e diminuindo as taxas de crescimento da célula (BEALES, 2004).

No salame, a Aw diminui gradualmente durante a sua secagem e as indústrias devem alcançar em seus produtos Aw 0,90 (BRASIL, 2000). Além da Aw, a umidade máxima de 35% também está determinada na legislação como parâmetro indicador de finalização do processo (BRASIL, 2000). Ambos os parâmetros estão relacionados entre si: a Aw é a quantidade de água disponível para o crescimento de micro-organismos; enquanto que a umidade inclui o teor de água indisponível para reações no alimento. Dessa forma, o valor de Aw, em relação ao crescimento de patógenos, é mais importante que a porcentagem de umidade (SPERBER, 1983). Embora existam esses parâmetros definidos em lei, encontram-se no varejo produtos que não cumprem ambas as determinações, colocando em risco a saúde do consumidor (CACCIOPOLLI *et al.*, 2006).

Parâmetro de perda de peso

A determinação da perda de peso é uma medida que demonstra a quantidade de água eliminada do embutido durante o período de secagem e não garante segurança microbiológica, pois não avalia parâmetros que limitam o crescimento bacteriano. Entretanto, pode ser um parâmetro fácil e não destrutivo para ser avaliado na elaboração (COROLLER *et al.*, 2015). Campagnol *et al.* (2011) citando Rust (1994) afirmaram que a perda ideal ocorre após redução de 30 a 40% do peso e, analisando outros estudos, valores dentro desse intervalo corroboraram com A_w abaixo de 0,90 (GARCIA; GAGLEAZZI; SOBRAL, 2000; MACEDO *et al.*, 2008; DALLA SANTA *et al.*, 2014).

2.3 Microbiologia preditiva

A microbiologia preditiva, que pode ser considerada um ramo da microbiologia de alimentos, objetiva avaliar quantitativamente o comportamento microbiano em alimentos e derivar adequados modelos matemáticos. Um modelo matemático é a descrição de um sistema real utilizando equações, a partir de dados gerados observados na população bacteriana, que descreverá combinações de condições que não foram testadas em experimentos (WHITING, 1995).

Os principais fatores que afetam a multiplicação microbiana são: pH, A_w , atmosfera, temperatura e presença de determinados ácidos orgânicos. Diferentes modelos permitem prever a inativação e a probabilidade de crescimento bacteriano no alimento sob esses fatores, considerando condições adicionais como estado fisiológico das células ou interação com outros micro-organismos por toda a cadeia de produção, desde a matéria prima até o produto final. Para as empresas produtoras de alimentos, a aplicação de uma ferramenta matemática é de grande importância, pois pode garantir a segurança e qualidade do alimento (WHITING, 1995; PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013). Para isso, *softwares* e sistemas para desenvolver modelos são utilizados para promover rápidas estimativas dos efeitos das formulações e processo, fatores de estocagem e vida de prateleira nos produtos, os quais seriam respostas de difícil obtenção com a microbiologia tradicional (CEPEDA *et al.*, 2013).

A microbiologia preditiva pode ser utilizada em muitas situações: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) para analisar perigos, identificar e estabelecer pontos críticos, determinar ações corretivas, avaliar interações das variáveis e nas Avaliações de Risco (AR) para estimar a população microbiana e sua dinâmica ao

longo da cadeia e avaliação de exposição de um patógeno específico. Além dessas, pode ainda ser utilizada na análise de vida de prateleira para prever crescimento de micro-organismos deteriorantes ou patogênicos nos alimentos, avaliar o efeito do processamento na qualidade e segurança dos alimentos e dar suporte às decisões quando implementadas operações diferentes durante a produção, avaliar impactos de desvios de processo na segurança e na qualidade dos alimentos (CAMPOS *et al.*, 2005; CEPEDA *et al.*, 2013).

2.3.1 Desenho experimental de um estudo

O desenho experimental de um estudo dependerá do modelo preditivo e da aplicação em um cenário real. Quando executado em uma matriz de alimento, o desenho será de acordo com a representatividade de dados em condições reais. Para esse propósito, é necessário entender os principais fatores que afetam o comportamento microbiano através de diferentes ensaios. Quanto maior o número de fatores, mais complexo torna-se o desenho experimental e mais dados reais são gerados (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013).

A seleção dos micro-organismos em modelos dependerá dos dados epidemiológicos que envolvem o alimento e a bactéria estudada. O ideal é utilizar micro-organismos que tenham sido isolados de formulações similares às do alimento escolhido para o estudo, além disso, patógenos de surtos de DTA também podem ser incluídos. De qualquer forma, é importante incubar o micro-organismo em condições padronizadas preferencialmente semelhantes às encontradas no alimento (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013).

Quando a microbiologia preditiva é utilizada com o propósito de avaliações de risco, a variabilidade do comportamento das cepas escolhidas é muito importante para a precisão e credibilidade do ensaio (NAUTA; DUFRENNE, 1999). Por isso, múltiplas cepas devem ser utilizadas, incluindo preferencialmente, cepas com características robustas de inativação, principalmente quando o ensaio emprega múltiplas condições de estresse. É comum também a utilização de coquetéis; entretanto, para a segurança de alimentos, cepas com comportamentos atípicos de resistência ao estresse devem ser evitadas para não superestimar os resultados (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2013).

Os modelos utilizados podem ser divididos em três grupos: crescimento, sobrevivência/inativação e crescimento/não crescimento onde a concentração do inóculo depende do objetivo do modelo. Quando o modelo objetiva avaliar a estabilidade do

produto, como a vida de prateleira, são utilizadas concentrações entre 10^2 e 10^3 UFC.g⁻¹, correspondendo a estudos de crescimento; entretanto, quando o estudo é para estimar um processo de letalidade, em modelos de sobrevivência/inativação, são indicadas concentrações mais altas que 10^6 UFC.g⁻¹. Dentre esses, existe uma distinção entre os conceitos de sobrevivência e de inativação. Nos modelos de sobrevivência, a condição ambiental ou o processo não intenciona a eliminação da população microbiana, enquanto na inativação o processo implementado objetiva a destruição do patógeno em um alimento (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013).

Para realizar a inoculação dos micro-organismos, é necessário manter os parâmetros da formulação do produto. Em matrizes líquidas com alta A_w (>0,96), o inóculo pode ser adicionado diretamente no produto, utilizando uma mínima quantidade de tampão ou água como veículo da cultura. Para alimentos com A_w intermediária, o diluente pode ser ajustado com a A_w da formulação (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013).

A frequência de análise depende das condições ambientais em que o alimento será submetido. No início do experimento, primeiros dias ou semana, devem ser coletadas amostras mais frequentemente (uma vez ao dia ou mais vezes por dia) e então reduzida a frequência com intervalos maiores. As curvas de crescimento e sobrevivência de micro-organismos devem ser construídas e os dados devem ser coletados ao longo de todo o período de análise do alimento (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013).

2.3.2 Estimação da concentração de células bacterianas

Na produção de alimentos, os micro-organismos podem não estar uniformemente distribuídos o que afeta a homogeneidade bacteriana e entre as unidades de alimentos coletados. Essa característica deve ser levada em conta no processo de modelagem da concentração e na escolha das distribuições de probabilidade utilizadas para representar, para efeitos de modelagem, a distribuição física de micro-organismos nos alimentos. A estimativa da concentração bacteriana, geralmente, envolve a coleta de frações, extraídas de vários locais dos alimentos (i.e. amostra). Para usar estes dados para inferência do parâmetro de concentração bacteriana, são feitas suposições, explícita ou implicitamente. Assim, as variações espaciais e temporais na distribuição das células são modeladas com

base nas suposições assumidas acerca das distribuições de probabilidade que melhor descrevem os parâmetros inferidos (EL-SHAARAWI; ESTERBY; DUTKA, 1981).

O método de contagem em placa é amplamente utilizado na quantificação dos micro-organismos patogênicos em alimentos. Apesar da sua popularidade esta técnica tem limitações. Usualmente a contagem é realizada com subamostras (da amostra original) diluídas serialmente, onde se presume que as células são distribuídas de acordo com uma distribuição de Poisson (ADAMS; MOSS, 2008). Nesse método, a seleção de qual diluição a ser utilizada é arbitrária, optando-se por selecionar placas que estejam dentro de uma faixa contável. Sendo assim, resultados com contagens abaixo de 25 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) são considerados não confiáveis, assim como resultados <1 UFC na placa de contagem, que não podem ser considerados como inexistência microbiana no alimento, pois o método apresenta um limite de detecção, implicando em incertezas na predição de micro-organismos (MCDONALD; SUN, 1999; SILVA *et al.*, 2010). Da mesma forma, o número de replicatas realizadas dentro da mesma amostra são arbitrárias e os dados são resumidos como estimativa pontual (média), negligenciando a variação e, conseqüentemente, perdendo informação (DUARTE, 2013).

Diante das limitações de inferência com as técnicas tradicionais de amostragem e contagem microbiana, a quantificação de incertezas associada às inferências pode ser realizada por meio de modelagem Bayesiana, que tem como característica levar em conta evidências obtidas de mensuração e de conhecimento *a priori*. De forma prática, um modelo Bayesiano pode ser usado para estimar a distribuição de probabilidade *a posteriori* de um parâmetro de interesse (e.g. UFC/g), descrevendo contaminação em produtos alimentícios em termos probabilísticos. Essa distribuição é usada para representar a variabilidade e a incerteza resultantes tanto da variação natural da concentração nos alimentos quanto das incertezas geradas nos processos de amostragem e subamostragem utilizados na quantificação (JARMAN *et al.*, 2008; BUSSCHAERT *et al.*, 2011).

2.3.3 Modelos preditivos e classificações

O objetivo dos microbiologistas é conhecer o comportamento dos micro-organismos nos alimentos submetidos a condições adversas. Com a utilização da microbiologia preditiva, o comportamento microbiano pode ser explicado com poucos

fatores ambientais (principalmente temperatura, pH e A_w), proporcionando assim, predições para a maioria dos alimentos (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013).

Com o objetivo de desenvolver estudos comparativos, muitos autores sugerem diferentes classificações de modelos preditivos baseados no propósito final. Existem os modelos cinéticos que compreendem a taxa de multiplicação microbiana e que podem prever o comportamento bacteriano por meio do seu crescimento exponencial ou formação de curvas sigmóides relacionados a parâmetros intrínsecos e extrínsecos como temperatura, pH ou A_w . Esses modelos são úteis pois podem prever as mudanças no crescimento microbiano em função do tempo, quando controlada uma variável que pode afetar o crescimento. O desenvolvimento de um modelo cinético pode ser difícil, pois é necessária a disponibilidade de muitos dados de parâmetros e contagens microbianas. Por outro lado, existem os modelos probabilísticos que preveem a probabilidade de ocorrer um dado evento e são comumente utilizados para modelos de bactérias esporuladas ou produção de toxinas. Às vezes, a utilização em conjunto desses tipos de modelos deve ser considerada, pois em situações adversas de crescimento, onde há ausência de crescimento microbiano, há sempre uma pequena probabilidade de haver crescimento (MCDONALD; SUN, 1999).

Outra classificação também utilizada é baseada no desenvolvimento de modelo: primário, secundário ou terciário (MCDONALD; SUN, 1999). O modelo primário prevê o crescimento bacteriano como uma função do tempo em condições ambientais constantes, tais como temperatura, pH, A_w , oxigênio, conservantes, etc. Os primeiros modelos eram simples equações de condições de multiplicação contra condições de não multiplicação. Mais tarde, os modelos descreveram o tempo entre a inoculação e a multiplicação microbiana (FORSYTHE, 2013). Através de poucos parâmetros, os modelos primários definem as fases de crescimento e inativação, ou seja, parâmetros cinéticos como máxima taxa de crescimento, fase lag, taxa de inativação em função do tempo de tratamento (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013). O modelo secundário, por sua vez, descreve as mudanças nos parâmetros dos modelos primários com os efeitos das condições ambientais (fatores físico-químicos e biológicos) e são os modelos comumente desenvolvidos e utilizados. Os modelos terciários são baseados em programas de computador que promovem uma interface entre a matemática e o operador, permitindo que os dados inseridos de modelos primários e secundários sejam estimados e observados em gráficos, predições e comparações. Através de um conjunto de regras

determinadas no *software* e os dados inseridos, o programa mimetiza o raciocínio e a tomada de decisões de um indivíduo (WHITING, 1995).

2.3.4 Modelos matemáticos desenvolvidos e descritos na literatura

Dentre os modelos primários de crescimento, a equação de Gompertz e Baranyi e suas modificações tornaram-se os modelos mais utilizados. No modelo de Gompertz, uma curva sigmoideal é produzida com quatro fases comparáveis às curvas de crescimento microbiano: lag, aceleração, desaceleração e estacionária (FORSYTHE, 2013). A curva gerada é excelente para descrever o crescimento a temperaturas constantes, mas não é a mais utilizada para temperaturas oscilantes (GOUMUDAVELLI *et al.*, 2007). Baranyi e Roberts (1994) propuseram um modelo para prever o crescimento do micro-organismo submetido a diferentes temperaturas, o qual adaptou melhor os dados experimentais do que a função de Gompertz. Nesse caso, assume-se que a bactéria necessita de um substrato desconhecido para o seu crescimento e crescem exponencialmente até terem o crescimento limitado pelo meio. Isso ocorre porque estas células se adaptam ao ambiente.

Os modelos secundários matemáticos podem ser divididos em duas abordagens: descrição dos fatores ambientais simultaneamente através da função polinomial; ou modelagem individual de cada fator em um modelo geral que descreve os efeitos combinados (WHITING, 1995). Os modelos Polinomiais (chamados de modelos de superfície) são modelos secundários de natureza empírica onde as maiores vantagens são a ampla possibilidade de inserção de dados e a fácil elaboração. Geralmente, equações polinomiais são usadas em três termos: primeira ordem, segunda ordem (quadrática) e interações. Esses modelos são caracterizados pela possibilidade de inclusão de um grande número de parâmetros que aumentam exponencialmente, quando aumentado o número de fatores incluídos (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013). Entretanto, nas curvas de crescimento e de inativação de micro-organismos, diferentes tipos de desvios de linearidade como formas sigmóides, com “ombros e caudas” podem ser observados. Embora modelos polinomiais sejam bastante utilizados, estes são incapazes de incluir essas características de curva ao modelo, o que poderia subestimar o risco (GONZÁLEZ; SKANDAMIS; HÄNNINEN, 2009). Por isso, outros modelos têm sido propostos para descrever curvas não-lineares (BUZRUL; ALPAS, 2007).

O modelo *Weibull* foi descrito como modelo de inativação para células vegetativas. Esse modelo é robusto para lidar com não linearidade nas curvas de

sobrevivência durante o processo de inativação, considerando as variações biológicas a respeito da inativação térmica. É amplamente utilizado na engenharia para descrever tempo de falha em eletrônicos e sistemas mecânicos, e também, é apropriado para a análise de dados de sobrevivência, ou seja, tempo de falha depois da aplicação do estresse (VAN BOEKEL, 2002). Embora esse modelo seja de natureza empírica, uma ligação pode ser realizada com efeitos fisiológicos, sendo utilizado na microbiologia com sucesso para descrever inativações não-lineares de diferentes micro-organismos sob diferentes condições experimentais. O mesmo incorpora os efeitos de cauda de duas fases de mortes, com a segunda fase apresentando uma taxa de morte mais baixa que a primeira (BUZRUL; ALPAS, 2007; GONZÁLEZ; SKANDAMIS; HÄNNINEN, 2009).

Uma forma de incorporar os fatores ambientais em modelos matemáticos é utilizar o conceito gamma. Quando utilizado este conceito em microbiologia preditiva, por vezes o modelo é chamado de modelo de conceito gamma (*gamma concept model*). Este permite a modelagem da influência de fatores ambientais (A_w , temperatura e pH) na taxa de crescimento máxima em relação à sua condição ótima de crescimento. Essa taxa de crescimento varia de zero a um, onde zero não apresenta crescimento em certa condição e um corresponde à condição de ótimo crescimento onde os fatores ambientais agem independentes na taxa de crescimento. Assim, os efeitos combinados do ambiente poderiam ser obtidos pela multiplicação dos efeitos separados de cada fator (ZWIETERING *et al.*, 1992; COROLLER *et al.*, 2012). Mais tarde, a introdução dos valores cardinais, também chamado de Modelo de Parâmetro Cardinal (CPM sigla em inglês) considerou que fatores ambientais interagem sinergicamente para determinar a taxa biocinética. Além disso, de acordo com o conceito gamma, esse modelo descreveu uma fórmula considerando os efeitos relativos de temperatura, A_w e pH, quantificando a influência desses fatores no crescimento bacteriano (ROSSO *et al.*, 1995; ROSSO; ROBINSON, 2001).

2.3.5 A utilização de meios artificiais em microbiologia preditiva

A geração de dados na microbiologia preditiva é fator importante para o desenvolvimento dos modelos matemáticos e pode ocorrer de diversas maneiras. Muitos estudos realizados em ambientes artificiais, como meios de cultura, tentam mimetizar as condições dos alimentos, fornecendo dados para serem utilizados nos modelos e para as suas validações matemáticas (SMITH *et al.*, 1975; GIBSON; ROBERTS, 1986; NISSEN;

HOLCK, 1998; DUFFY; GRAU; VANDERLINDE, 2000; WILLIAMS; GOLDEN, 2001; NIGHTINGALE *et al.*, 2006; HWANG *et al.* 2009). Outros estudos modelam o comportamento bacteriano a partir de seus próprios experimentos em meios artificiais, simulando inúmeras condições ambientais (GIBSON; BRATCHELL; ROBERTS; 1988, DUFFY; WHITING; SHERIDAN, 1999).

Esses modelos descritos sob condições estáticas podem oferecer uma resposta rápida, conveniente e econômica de comportamento do micro-organismo; entretanto, apresentam dificuldade em realizar previsões precisas do crescimento microbiano em uma matriz de alimento, pois a variação de comportamento bacteriano é inevitável em matrizes complexas como a carne, por exemplo (MCDONALD; SUN, 1999; BUZRUL; ALPAS, 2007). Dessa forma, resultados a partir de caldos de cultivo podem ser falhos e muitos fatores podem contribuir para isso: bactérias crescem mais rápido em meio líquido, há ausência de microbiota normal competitiva, os substratos são diferentes e há homogênea distribuição do micro-organismo. Para fins práticos, os modelos devem ser validados, utilizando patógenos em alimentos reais em condições que simulem as situações encontradas na prática industrial (MCMEEKIN *et al.*, 1997).

2.3.6 Modelos matemáticos aplicados em produtos embutidos maturados

Muitos estudos conduzidos na matéria prima do alimento demonstram a redução de patógenos, modelando sua inativação e podem ser importantes ferramentas para o controle de patógenos durante o processamento de alimentos. Especificamente, em embutidos RTE, que dependem da diminuição de pH e A_w durante a fermentação e a secagem para garantir a inocuidade, diferentes modelos foram testados para descrever o comportamento de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* O157:H7 (PORTO-FETT *et al.*, 2008; PRAGALAKI; BLOUKAS; KOTZEKIDOU, 2013; COROLLER *et al.*, 2015).

Hwang *et al.* (2009), utilizaram equações polinomiais para descrever a inativação de três patógenos (*E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium*) durante a fermentação, secagem e estocagem em embutido tipo mediterrâneo fermentado (Soudjouk-style). Em outro estudo, um embutido tradicional da Turquia chamado *Sucuk*, foi testado para sobrevivência de *L. monocytogenes*, bactérias aeróbicas e ácido láticas e fungos durante a maturação e a estocagem do produto (ERKMEM, 2008). A amostragem foi considerada a partir de um dia de maturação, pois o crescimento observado no

primeiro dia não foi incluído nos modelos. Os dados de sobrevivência foram descritos pelo modelo de Gompertz-modificado e um modelo logístico onde os seus desempenhos foram analisados a partir da comparação dos resultados preditos e obtidos no experimento aos valores obtidos em outros modelos. Ambos os modelos demonstraram uma adequada predição dos resultados (ERKMEM, 2008).

Diferentemente, Coroller *et al.* (2015) utilizaram um conjunto de modelos que abrangeu as três fases: crescimento, limites de crescimento e inativação baseado em modelos logístico, Cardinal, Weibull e o conceito gamma para quantificar o comportamento de *Salmonella* Typhimurium durante o processamento de embutido fermentado francês. O estudo incluiu a etapa de crescimento inicial, seguida da etapa de inativação na maturação, considerando temperatura, pH, bactérias ácido láticas, Aw, testando diferentes concentrações de carboidratos e sal e tipos de culturas *starters* para alterar o pH final. O modelo descreveu o comportamento de *Salmonella* Typhimurium nessas diferentes condições.

2.3.7 Validação do modelo matemático

Uma etapa necessária na microbiologia preditiva após o desenvolvimento e aplicação do modelo matemático é a sua validação. A validação permite ao pesquisador testar a eficácia do modelo utilizado na predição do comportamento do patógeno no alimento (JUNEJA *et al.*, 2014). A validação na matriz do alimento é necessária para observar vieses do modelo e testá-lo, isso envolve a comparação dos dados observados no modelo preditivo com os dados observados em um “Teste de Desafio” (experimento realizado no alimento). Além do Teste de Desafio outras formas de validação podem ser realizadas a partir de dados advindos da literatura ou novos dados laboratoriais ou testes na indústria (CAMPOS *et al.*, 2005).

Quando a validação é realizada nas mesmas condições do experimento que foram retirados os dados para elaborar o modelo, denomina-se validação interna e objetiva determinar se o modelo é capaz de descrever os dados do experimento. Na validação externa, a comparação é feita entre predições e dados independentes que foram retirados de outros Testes de Desafios ou dados da literatura (PÉREZ-RODRÍGUEZ; VALERO, 2013).

3 PROBLEMA DE PESQUISA

- a) É possível prever o comportamento de *Salmonella enterica* durante a elaboração de salame, em condições típicas de produção no Brasil, por meio de um modelo matemático?

- b) As etapas de elaboração do salame, em condições típicas de produção no Brasil, serão capazes de eliminar *Salmonella enterica*?

4 HIPÓTESE DE PESQUISA

- a) O comportamento de *Salmonella enterica* será predito por meio do modelo matemático o qual será confirmado com uma validação.

- b) A etapa de fermentação do salame será capaz de eliminar *Salmonella enterica*.

- c) A etapa de dessecação do salame será capaz de eliminar *Salmonella enterica*.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

Contribuir para o conhecimento do comportamento de *Salmonella enterica* durante as etapas de elaboração de salame conforme a forma de produção industrial brasileira.

5.2 Específico

- a) Determinar a curva de atividade de água (A_w) e pH durante a maturação de salame.
- b) Determinar a curva de comportamento de um coquetel de sorovares *Salmonella enterica* durante a maturação de salame.
- c) Aplicar um modelo matemático para prever o comportamento de *Salmonella enterica* durante a elaboração de salame.
- d) Validar o modelo matemático aplicado.

6 METODOLOGIA

6.1 Delineamento do estudo

Foi conduzido um estudo descritivo do comportamento de *S. enterica* durante as etapas de elaboração de salame inoculado com um coquetel de sorovares da referida espécie bacteriana. Os dados populacionais obtidos no estudo foram inseridos em modelo preditivo que descreveu os efeitos e as interações de A_w , pH e temperatura na inativação de *S. enterica*. Após a aplicação do modelo matemático, o mesmo foi validado pela comparação da sua curva predita com a curva observada durante a elaboração de salame.

6.2 Escolha de cepas provenientes da bacterioteca do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva- UFRGS para comporem o coquetel de sorovares de *Salmonella enterica*

Um coquetel de sorovares de *S. enterica* foi preparado para ser adicionado à massa cárnea para elaboração dos salames do estudo. *Salmonella* Typhimurium, *S. Derby* e *S. Infantis* foram os sorovares escolhidos para comporem o coquetel, com base na ocorrência em suínos e produtos de origem suína, bem como na importância citada na literatura como causador de surtos em humanos. Quatro cepas de *S. enterica* pertencentes aos referidos sorovares e que estavam armazenadas na bacterioteca do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva (UFRGS) compuseram o coquetel. Para assegurar a validade externa do modelo matemático testado, um teste de desempenho em pH 5 de cepas da coleção pertencentes aos referidos sorovares serviu de critério para a escolha das mesmas. Além dessas, a cepa referência *S. Typhimurium* ATCC 14028 foi adicionada ao coquetel, totalizando cinco cepas.

6.2.1 Teste de desempenho

Na bacterioteca estavam armazenadas 32 cepas isoladas de embutidos elaborados com carne suína: 12 cepas de *S. Derby*, 12 cepas de *S. Typhimurium* e quatro cepas de *S. Infantis* oriundas de linguiça frescal; e quatro cepas de *S. Typhimurium* oriundas de salame (APÊNDICE B).

Todas as cepas estavam mantidas na bacterioteca em glicerol a -18°C e foram reativadas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid) e confirmadas

fenotipicamente quanto à identidade (QUINN *et al.*, 2011). As culturas individuais foram preparadas realizando duas transferências, em série, em caldo BHI com 10% de glicose, incubado a $37^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 18 horas, para prévia adaptação das cepas.

Para o teste de triagem, primeiramente um *mix* de quatro cepas de mesmo sorovar e mesma origem foi preparado. O mix foi constituído por uma alíquota (1 mL) de cultivo de cada uma das cepas. De cada *mix*, foram realizadas quatro diluições seriadas em base dez em Água Peptonada 0,1% (AP 0,1 %). A partir da diluição 10^{-4} , alíquotas de 100 μL foram transferidas para caldo BHI ajustado para pH 5 com ácido láctico 85%. Cada mix de cepas foi incubado em BHI pH 5 a $37^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 24 h. Antes e após a incubação, foi conduzida a enumeração de bactérias viáveis presentes no caldo BHI pH 5 em ágar Desoxicolato Lisina Xilose (XLD, Oxoid) conforme descrito em SILVA *et al.* (2010). As colônias características foram enumeradas e multiplicadas pelo inverso da diluição em que foi realizada a contagem.

Os *mix* que apresentaram maiores taxas de crescimento tiveram as cepas individualmente testadas em BHI pH 5, como já descrito. A partir disso, foram definidas as cepas com os melhores desempenhos em cada um dos sorovares e origens.

6.2.2 Determinação do perfil de macrorrestrição das cepas de *Salmonella enterica* para formação do coquetel

A cepa que apresentou melhor desempenho em BHI pH 5, entre as cepas de *S. Derby* e *S. Infantis* foram submetidas à macrorrestrição com a enzima *XbaI* seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE, sigla em inglês). Para *S. Typhimurium* todas as cepas que apresentaram crescimento em BHI pH 5 e a cepa referência *S. Typhimurium* ATCC 14028 foram submetidas à macrorrestrição para determinação do perfil (pulsotipo). Os pulsotipos apresentados pelas cepas de *S. Typhimurium* foram um critério adicional para a escolha das cepas do coquetel, sendo eleitas as duas cepas com melhor desempenho em caldo BHI pH 5 que apresentaram ao menos uma banda de diferença entre si e com a cepa referência *S. Typhimurium* ATCC 14028.

Para a realização da macrorrestrição, o DNA total foi extraído com 25 μL da enzima Proteinase K (20mg/mL, Thermo Scientific) e clivado com 5 μL da enzima *XbaI* (10U/ μL , Thermo Scientific e Promega), conforme o protocolo para *Salmonella serotypes* descrito em *PulseNet Methods* (CDC, 2017). A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose 1% utilizando tampão 0,5X Tris-borato-EDTA no sistema CHEF DR-II (BioRad Laboratories) ajustado para tempo inicial 2,2 segundos, tempo final

63,8 segundos, voltagem 6 volts e tempo de corrida de 20 horas à 14°C conforme descrito em *PulseNet Methods* (CDC, 2017). Como referência de tamanho de fragmentos gerados foi utilizada a cepa de *Salmonella* Braenderup (H9812). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1µg/mL, Sigma), durante 30 minutos, fotodocumentado em transiluminador onde a imagem foi capturada e digitalizada pelo sistema L-Pix Touch System5 (Loccus).

6.3 Preparo do coquetel de *Salmonella enterica* para adição na massa do salame

As cepas selecionadas foram adaptadas individualmente em caldo BHI adicionado de 10% de glicose (conforme item 6.2). Após, foram submetidas a duas transferências consecutivas para 10 e 20 mL de caldo BHI (Oxoid) e incubação a 37°C±2 durante 18 horas. Ao final, as culturas foram centrifugadas a 3800 g por 40 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento de células foi reconstituído em 2 mL de solução salina 0,85%. O inóculo de *Salmonella enterica* foi ajustado na concentração de aproximadamente 10 log UFC. mL⁻¹, com auxílio de escala de Mc Farland.

Um coquetel com as cinco cepas foi preparado através da transferência de uma alíquota de 2 mL de cada suspensão de aproximadamente 10 log UFC. mL⁻¹ para um tubo estéril.

6.4 Elaboração do salame

Foram elaboradas três bateladas de salame, sendo a primeira para a realização do estudo Piloto, a segunda para o estudo Base e a terceira para o estudo Validação. A seguir serão explicadas as etapas para elaboração do salame.

6.4.1 Formulação da massa cárnea

A formulação da massa (Quadro 1) foi definida a partir de receitas típicas de salames industrializados no Brasil.

Quadro 1- Lista de ingredientes e quantidades utilizadas para o preparo de aproximadamente 1000 g de massa de salame.

Ingredientes	Quantidade (g)
Carne suína (paleta)	852
Toucinho (região costal)	108
Nitrato de sódio	0,21
Nitrito de sódio	0,12
Cloreto de sódio	19,5
Cultura <i>starter</i>	0,20
Glicose	9,1
Eritorbato de sódio	0,5
Glutamato monossódico	0,65
Alho em pó	2,4
Pimenta preta	2,4
Páprica doce	2,4
Coentro	2,4
Total	1000

Fonte: a própria autora

6.4.2 Preparo da cultura *starter* adicionada à massa do salame

A cultura *starter* Lyocarni (SBM-11, Sacco Brasil), contendo *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus* e *Lactobacillus sakei*, foi preparada conforme recomendação do fabricante (0,2g/Kg de carne). Para verificar a quantidade de bactérias presentes no inóculo, uma alíquota de 1 mL da solução preparada, foi submetida à enumeração em ágar Mann Rogosa Sharpe (MRS, Merck) pela técnica de “pour plate” com sobrecamada. As placas foram incubadas em microaerofilia por 48 horas a 30°C. A enumeração indicou uma população de aproximadamente 6 log UFC.g⁻¹ na cultura *starter* adicionada à massa.

6.4.3 Preparo da massa do salame

A carne suína (paleta desossada), obtida de matadouro frigorífico sob Serviço de Inspeção Estadual, foi moída com lâmina de 6 mm. O toucinho, adquirido no mesmo estabelecimento, foi picado com faca em cubos de 6 mm, no dia anterior ao embutimento. A carne foi resfriada a 4°C e o toucinho congelado a -18°C até o momento da utilização.

Para a elaboração da massa de salame, todos os ingredientes foram pesados, individualmente, conforme a formulação determinada (Quadro 1). A carne, moída e resfriada, foi misturada manualmente ao toucinho congelado, aos ingredientes e à cultura *starter* previamente preparada conforme item 6.3.2. O sal e o eritorbato de sódio foram adicionados por último. Após a homogeneização da massa, esta foi refrigerada (4°C) por uma hora.

6.4.4 Adição de líquidos à massa

Após o preparo, a massa foi dividida em duas porções; a uma delas foi adicionado o coquetel de cepas de *Salmonella enterica*. Para tanto, 1 mL do coquetel preparado como descrito em 6.3 foi adicionado a porções de 100 g de massa para facilitar a homogeneização. Posteriormente, essas porções foram misturadas para formar a massa final para embutimento. A concentração final de *S. enterica* na massa foi de aproximadamente 8 log UFC.g⁻¹ de salame.

A segunda porção, não adicionada de coquetel de *S. enterica*, foi preparada para realização das análises de Aw, visto que, por razões de biossegurança, amostras analisadas em área externa ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva (UFRGS) não poderiam estar inoculadas com *S. enterica*. A essa porção foi adicionada solução de NaCl 0,85% em quantidade equivalente a 1% do peso da massa para embutimento do salame.

6.4.5 Embutimento

A massa preparada como descrita em 6.4.4 foi embutida em envoltório natural bovino. Anteriormente à sua utilização, o envoltório foi hidratado, lavado e, então, submerso em vinagre branco, durante 4 horas. Após esse período, foi novamente lavado em água corrente para retirada da solução acética. O envoltório foi inserido no funil do moedor de carne hidráulico provido de disco vazado. A massa cárnea foi colocada no moedor e foram embutidos salames medindo aproximadamente 15 cm de comprimento, constituídos por aproximadamente 200 g de carne. Primeiramente, foi embutida a massa não contaminada pelo coquetel de *S. enterica*; seguida da massa contaminada. Os salames foram amarrados com barbante, evitando a entrada de ar no embutido.

6.4.6 Identificação dos salames preparados

Os salames recém-embutidos foram identificados por meio de etiquetas (Figura 2), conforme os grupos a que pertenciam. Dessa forma, salames não contaminados, que seriam utilizados para análise de Aw, foram identificados com algarismos romanos. Salames que haviam sido inoculados com coquetel de *S. enterica* foram identificados com algarismos arábicos.

Figura 2: Salames recém-embutidos, identificados por etiquetas.



6.4.7 Câmara de maturação utilizada e pendura dos salames

Uma câmara de maturação medindo 100 cm x 85 cm x 60 cm em seu compartimento interno foi construída. No seu interior varas de aço inox foram colocadas para a pendura dos salames (Figuras 3 e 4). O espaço interno da câmara de maturação foi dividido em duas áreas: A e B (Figura 4).

Para garantir a aleatoriedade do local onde os salames seriam pendurados, foi realizado sorteio. Papéis com os números que constavam nas etiquetas dos salames contaminados com coquetel de *S. enterica*, foram colocados em uma urna e retirados, individualmente, para cada uma das posições da área de pendura (Figura 5). Assim, todos os salames contaminados tiveram a mesma chance de serem alocados em uma determinada posição na câmara de maturação. Da mesma forma, os salames não contaminados, identificados foram sorteados de forma que todos também tivessem igual chance de serem posicionados no centro (entre as áreas A e B) e nas duas extremidades

(esquerda e direita) da câmara de maturação (Figura 5). Após a pendura, a câmara foi fechada e foi iniciado o protocolo de maturação.

Figura 3: Câmara de maturação fechada.



Figura 4: Compartimento interno da câmara de maturação, dividido em área A e B, com varas de aço inox já com a posição identificada dos salames a serem pendurados, conforme definido por sorteio.

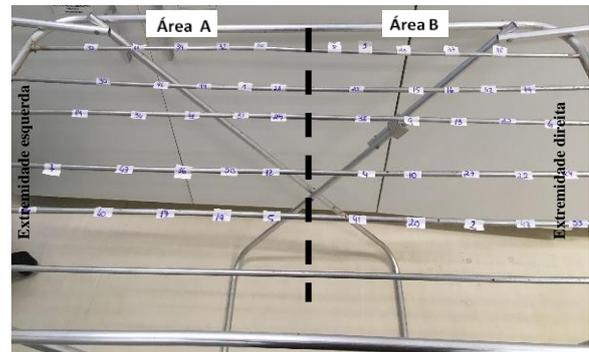


Figura 5: Esquema de posicionamento de salames dentro da câmara de maturação a partir de um sorteio hipotético de 45 salames contaminados identificados de 1 a 45 e seis salames não contaminados identificados de I a VI.

Área A					Área B							
I	18	49	6	24	33	V	35	28	29	12	5	II
	37	42	23	22	47		32	1	31	50	19	
VI	21	16	13	27	2	III	39	44	48	36	17	
	3	15	9	10	20		11	46	34	43	40	
	8	25	38	4	41	IV	45	30	14	7	26	

Para que fossem alcançadas temperatura e UR planejadas para os estudos a câmara foi mantida em sala provida de ar condicionado Split 11.500 BTU's (LG). Além disso, no interior da câmara foi colocado em um umidificador Fashion Air (Mondial) com capacidade de cinco litros de água. Para garantir a homogeneidade da distribuição de umidade, a posição do umidificador no interior da câmara foi modificada duas vezes ao

dia. Ambos os parâmetros (temperatura e de umidade), foram monitorados diariamente por meio de Termohigrômetro Digital (Kasvi) e registrados em planilha, durante o período de maturação.

6.5 Protocolo de maturação

Os embutidos elaborados, como descrito em 6.4, foram submetidos ao protocolo de maturação, quando o comportamento de *S. enterica* foi observado. Três estudos independentes foram conduzidos: Piloto, Base e de Validação.

6.5.1 Estudo Piloto

O estudo Piloto foi realizado para: testar a receita de ingredientes; determinar o número de salames necessários para a realização do estudo Base, definido de acordo com a frequência de amostragem requerida; e avaliar a capacidade e o desempenho da câmara de maturação.

Um plano de amostragem foi arbitrariamente estabelecido, de forma que permitisse a coleta de grande número de informações microbiológicas e físico-químicas. Para isso, quatorze quilos de massa foram preparados, sendo elaborados 64 salames adicionados do coquetel de sorovares de *S. enterica*, preparado conforme item 6.3. A análise de pH, foi realizada concomitante às análises de quantificação microbiana, pois era necessário identificar o momento de queda e elevação do pH ao longo da maturação.

Para coleta de amostra para análise de Aw, seis salames não adicionados do coquetel de *S. enterica* foram elaborados, correspondendo a seis pontos de medição de Aw. Diferentemente do pH, dados de literatura apontavam um comportamento regular e constante na perda de Aw durante a maturação de salames (CORBELLINI *et al.*, 2017). Assim, poucos pontos seriam suficientes para construção de uma curva desse parâmetro.

Todos os salames foram identificados, pendurados na câmara de maturação (conforme item 6.4) e maturados à temperatura ambiente de 25°C com UR de 99% a 95% e, posteriormente, à temperatura de 18°C com UR do ar gradativamente reduzida de 95% a 70%. Os cinco primeiros salames contaminados amostrados foram colhidos e analisados em intervalos arbitrariamente estabelecidos de quatro a seis horas. Após, os intervalos das coletas foram sucessivamente ampliados para 12, 72, 96 e 120 horas conforme os

resultados da quantificação realizada no dia anterior. As coletas de amostras e análises microbiológica e físico-química foram realizadas conforme descrição nos itens 6.5 e 6.6.

6.5.2 Estudo Base

A partir dos resultados do estudo Piloto, salames, elaborados como descrito no item 6.4 foram maturados na câmara testada. O número de salames a serem produzidos foi estabelecido a partir da frequência de amostragem determinada pelo estudo Piloto. Para garantir um bom desempenho da câmara de maturação na época do ano de realização do estudo Base, o protocolo de maturação foi ajustado para uma temperatura acima de 25°C para fermentação e de 18°C para dessecação. De acordo com protocolos aplicados pelas indústrias e publicações brasileiras, ficou estabelecido para o estudo Base o seguinte protocolo: 30°C na fermentação com UR de 99% a 95%; e 20°C na secagem com UR do ar gradativamente reduzida de 95% até 70%. As coletas e análises microbiológica e físico-químicas foram realizadas conforme descritos nos itens 6.6 e 6.7.

Os resultados do comportamento de *S. enterica*, da Aw e pH dos salames durante o período de maturação foram utilizados para a aplicação de modelo matemático como descrito no item 6.10.

6.5.3. Estudo Validação

Para validação do modelo matemático, foi conduzido um novo estudo do comportamento de *S. enterica* durante o período de maturação. Obrigatoriamente, a validação deveria ser realizada em um cenário diferente do estudo Base.

Assim o estudo, denominado Validação, foi conduzido da mesma forma que o estudo Base, exceto pelo protocolo de maturação (temperatura da fermentação e da dessecação), a fim de testar o desempenho do modelo. O seguinte protocolo de maturação foi estabelecido: 25°C na fermentação com UR de 99% a 95%; e 18°C na dessecação com UR do ar gradativamente reduzida de 95% a 70%. Nesse estudo, apenas a área A da câmara de maturação foi utilizada, pois apenas uma unidade amostral contaminada foi analisada nas coletas realizadas. O menor número de observações foi possível, pois o estudo não seria utilizado para extrair parâmetros para a modelagem. Nesse caso, eram apenas necessárias as construções das curvas de crescimento e inativação bacteriana, pH

e A_w em que os dados observados pudessem ser comparados à curva predita pelo modelo matemático aplicado.

A coleta de amostras e análises realizadas nos salames foram conduzidas conforme 6.6 e 6.7. Os resultados do comportamento de *S. enterica*, da A_w e pH dos salames durante o período de maturação foram utilizados para validar o modelo matemático.

6.6 Coleta de amostras

Cada salame elaborado correspondeu a uma unidade amostral independente que foi analisada por método destrutivo. Duas unidades amostrais de salames inoculados com coquetel de *S. enterica*, sendo uma proveniente de cada uma das áreas (A e B) da câmara de maturação, foram colhidas para a realização da quantificação de *S. enterica*, análise de pH e pesagem. Assim, salames de diferentes áreas foram amostrados, simultaneamente, com a mesma sequência nas duas áreas (ordem indicada por numerais ordinais nos quadrados da Figura 6), a fim de minimizar uma possível diferença na inativação bacteriana devido à heterogeneidade de UR da câmara de maturação.

Figura 6: Ordem de coleta das unidades amostrais na câmara de maturação. Os numerais ordinais nos quadrados indicam a ordem de coleta dos salames contaminados dispostos nas áreas A e B. Os numerais ordinais nas esferas indicam a ordem de coleta das unidades amostrais não contaminadas. As cores indicam que salames de posição correspondente nas áreas A e B são amostrados

Área A					Área B					
1º	6º	14º	20º	25º	1º	6º	14º	20º	25º	
1º	10º	2º	7º	15º	21º	2º	10º	7º	15º	3º
	17º	11º	3º	8º	16º	17º	11º	3º	8º	16º
	22º	18º	12º	4º	9º	22º	18º	12º	4º	9º
5º	24º	23º	19º	13º	5º	24º	23º	19º	13º	5º

Para a realização da análise de Aw, foram colhidas unidades amostrais não contaminadas e, para estas, a ordem de colheita foi determinada de modo que sempre intercalasse um salame pendurado na extremidade e outro no centro da câmara de maturação (ordem indicada por numerais ordinais nas esferas da Figura 6).

6.7 Análises microbiológica e físico-químicas

A seguir serão apresentadas as análises realizadas em unidades amostrais colhidas nos estudos Piloto, Base e Validação.

6.7.1 Quantificação de *Salmonella enterica* em unidades amostrais de salame

As coletas de unidades amostrais para análise foram realizadas na frequência estabelecida em 6.5 e da forma descrita em 6.6.

Após a retirada da unidade amostral da câmara de maturação, a mesma foi levada a uma capela de fluxo laminar para retirada da unidade analítica. O envoltório da unidade amostral foi retirado e foram colhidas 25g da porção interna do salame, adicionadas a 225 mL de APT 1% e homogeneizadas (Food Samples Homogenizers, Logen Scientific) por um minuto.

A partir da suspensão inicial, diluições seriadas em 9 mL de Água Peptonada 0,1% (AP 0,1%) foram realizadas. A partir de cada diluição, 0,1 mL foi inoculado em duplicata

na superfície de placas de ágar XLD (Oxoid). Paralelamente, alíquotas de igual volume foram semeadas em ágar TAL (ágar XLD + ágar TSA -Tryptona de Soja (Oxoid)). Essa técnica, descrita por Kang; Fung (2000) e Nithingale *et al.* (2006) é constituída pela semeadura das alíquotas na superfície de ágar XLD previamente preparado com sobrecamada de ágar TSA. Essa modificação possibilitaria a recuperação de um maior número de células bacterianas injuriadas.

Após incubação, de ambos os meios, por 48 horas a $37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, as colônias típicas foram quantificadas. Três colônias foram repicadas para ágar TSA para confirmação fenotípica da espécie *S. enterica*, segundo Quinn *et al.* (2011).

Para identificação das cepas presentes ao final do período de maturação do salame, dez colônias da última amostragem realizada em que houve crescimento de *S. enterica* foram colhidas. Para tanto, as placas com crescimento foram colocadas sobre um molde, onde estavam indicados os dez pontos de onde uma colônia deveria ser colhida. As colônias indicadas pelo molde foram repicadas, confirmadas por métodos fenotípicos como *S. enterica* e submetidas à macrorrestrrição, conforme descrito no item 6.2.2.

Amostras com número de *S. enterica* abaixo do limite de detecção em meios sólidos pela técnica da quantificação acima descrita foram testadas para presença de *S. enterica* de acordo com ISO 6579-2000.

6.7.2 Análises físico-químicas

Determinação do pH

O pH foi medido em cada unidade amostral colhida para análise microbiológica. Para tanto, 20g da amostra de salame foi suspendida em 200 mL de água destilada e homogeneizada (Food Samples Homogenizers, Logen Scientific). O pH do homogeneizado foi medido em pHmetro DM-22 (Digimed) previamente calibrado. Para cada amostra, foram realizadas três medições e calculada a média das leituras obtidas.

Determinação de atividade de água (Aw)

A análise da Aw foi realizada em unidades amostrais de salames não inoculados com *S. enterica*. As amostras foram transportadas em caixa isotérmica a um laboratório de análises físico-química de alimentos externo ao Setor de Medicina Veterinária Preventiva, onde foram realizadas as análises. Três gramas de cada amostra foram maceradas manualmente e colocadas em cápsulas EPW (Probeschalen) para aferir a Aw

no aparelho Lab Touch - Aw (Novasina). A análise foi realizada a 25°C, em triplicata, para cada unidade amostral de salame. A média das três leituras foi calculada.

Pesagem

A pesagem de cada unidade amostral dos salames inoculado e não-inoculado foi realizada imediatamente ao final do embutimento em balança analítica KN 300 (Digimed). No momento da coleta para realização das análises microbiológica e físico-química as unidades de salame foram novamente pesadas.

6.8 Medidas de biossegurança adotadas durante o estudo

Os salames foram elaborados em sala de acesso restrito, localizada no Setor de Medicina Veterinária Preventiva. Na sala restrita, encontravam-se a câmara de maturação, equipamentos e utensílios utilizados no estudo, os quais foram destinados ao uso exclusivo das atividades de preparo, embutimento e coleta de amostras.

A equipe de colaboradores utilizou equipamentos de proteção individual como luvas, toucas e jalecos durante o preparo da massa, embutimento e pendura dos salames. Para manipulação e análise dos salames após o preparo, utilizaram-se luvas e jalecos.

No início de cada batelada de massa cárnea para a elaboração dos salames, todos equipamentos e utensílios que entrariam em contato com a massa cárnea foram higienizados com álcool 70°GL. Ao término de cada batelada de salame, as partes do equipamento utilizadas para moagem da carne e embutimento, que entraram em contato com a massa, foram descontaminadas por fervura durante 15 minutos e a seguir lavadas com detergente neutro. Utensílios como facas, tesouras, funil, tábua de vidro e bandejas foram esterilizados por autoclavagem (30 min a 121°C/1 atm) e, após, lavados com detergente neutro.

Após as análises físico-químicas e microbiológicas, todo o material descartável utilizado e o restante das amostras analisadas foram autoclavados durante 30 min a 121°C/ 1 atm antes de serem descartados.

6.9 Análise estatística

6.9.1 Comparação do desempenho dos meios de cultura XLD e TAL (XLD+TSA) na quantificação de *Salmonella enterica* durante a maturação de salames

A população microbiana foi determinada pela multiplicação do número de colônias confirmadas pelo inverso da diluição em que foi realizada a contagem e expressa em log UFC.g⁻¹. As médias calculadas a partir das contagens de unidades formadoras de colônia de *S. enterica* em ágar XLD e ágar TAL foram comparadas e analisadas estatisticamente pelo Teste t para amostras pareadas. Diferenças de médias com valor de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas.

6.9.2 Concentração de *Salmonella enterica* por inferência Bayesiana

As contagens de células observadas no estudo Base e Validação foram analisadas por inferência Bayesiana para inferir a concentração de *S. enterica* por grama e avaliar a variabilidade e incerteza da amostragem e das diluições utilizadas na quantificação bacteriana. A modelagem foi aplicada às contagens (UFC) obtidas nas placas do meio de cultura (XLD ou TAL) que apresentou o melhor desempenho em recuperar as células de *S. enterica*.

Nesse caso, cada i -ésimo experimento de contagem nas j -ésimas placas das k -ésimas repetições ($y_{i,j,k}$) é considerado uma realização de uma variável aleatória de Poisson, $y_{i,j,k} \sim \text{Poisson}(l_{i,j})$. O parâmetro $l_{i,j}$ (LogUFC/placa) que corrigido pela fração de amostra semeada para contagem tem uma priori Gamma, $\lambda_i \sim \text{Gamma}(5, 20 * d_i)$, sendo d_i a diluição utilizada na i -ésima contagem. Os parâmetros da Gamma são de forma e escala e foram escolhidos de acordo com (SMID *et al.*, 2013). Para a modelagem foram utilizadas 100000 iterações $burnin=100$ e $thin=20$. As análises foram realizadas com os pacotes BRugs e coda no software OpenBUGS por meio do R.

6.9.3 Estimação dos parâmetros e das variáveis ambientais

Os dados referentes às variáveis ambientais foram ajustados por meio de interpolação linear nos casos de pH e temperatura.

Para a Aw foi assumido que a redução segue uma taxa de decaimento proporcional à quantidade de Aw, sendo descrita por meio da equação diferencial:

$$\frac{dy}{dt} = -\beta y, \quad (1)$$

onde β é uma constante ajustada com base nos dados observados.

Resolvendo a equação 1 com os valores iniciais observados em cada experimento, obteve-se:

$$y = y_0 \cdot e^{-t\beta}, \quad (2)$$

em que t é o tempo em horas, y_0 é a quantidade de Aw no momento inicial, $\beta=0,000244$ utilizado no estudo Base e $0,000207$ no estudo Validação, ambos por minimização do erro quadrático médio.

A perda média total diária de Aw das unidades amostrais da hora zero até o final da maturação foi dividida pelo número de horas de maturação em cada estudo.

6.10 Modelagem matemática

A seguir serão descritos os modelos matemáticos aplicados aos dados adquiridos nos estudos Base e Validação.

6.10.1 Definição do modelo matemático

A escolha do modelo matemático foi fundamentada em sua base teórica (característica do modelo e utilizações) e no comportamento das variáveis. Dessa forma, o modelo “conceito gamma” proposto por Coroller *et al.* (2015) foi aplicado ao estudo por abranger as fases de crescimento e inativação bacteriana.

6.10.2 Dinâmica de crescimento e inativação bacteriana

A abordagem proposta baseada no “conceito gamma”, descreve a interação dos fatores ambientais no crescimento ou a inativação dos micro-organismos.

Modelo de crescimento bacteriano

O crescimento bacteriano foi modelado em função da temperatura, A_w e pH e utilizando valores cardinais destas variáveis (Quadro 2). Seja N o tamanho populacional de bactéria (log UFC.g⁻¹), a variação de N é dada por:

$$\frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = \mu_{opt} \prod_j^3 \gamma_j \xi \quad (3)$$

onde μ_{opt} é uma constante específica de crescimento de *S. enterica* (logUFC/ghora⁻¹) e quando $j=1$ foi modelada a temperatura, $j=2$ foi modelada a A_w e $j=3$ foi modelado o pH.

Quadro 2: Parâmetros ambientais e seus valores cardinais de crescimento de *Salmonella* Typhimurium determinados segundo Coroller *et al.* (2015).

Parâmetros ambientais	Fixas crescimento	Valor cardinal (unidade)	Descrição
pH	pHmax	10,42	pH máximo: valor máximo limite para ocorrer crescimento bacteriano
	pHmin	3,58	pH mínimo: valor mínimo limite para ocorrer crescimento bacteriano
	pHopt	7	pH ótimo: valor em que ocorre a maior taxa de crescimento bacteriano
aW (Atividade de água)	aWmax	1	aW máxima: valor máximo limite para ocorrer crescimento
	aWmin	0,951	aW mínima: valor mínimo limite para ocorrer crescimento
	aWopt	0,997	aW ótima: valor em que ocorre a maior taxa de crescimento
T (Temperatura)	Tmax	46,48	T máxima: valor máximo limite para ocorrer crescimento bacteriano
	Tmin	5,06	T mínima: valor mínimo limite para ocorrer crescimento bacteriano
	Topt	39,3	T ótima: valor em que ocorre a maior taxa de crescimento bacteriano

O parâmetro ξ representa a interação dos j fatores ambientais mencionados. Os j parâmetros ambientais, em cada intervalo i de tempo, foram estimados pela função:

$$\gamma(x_{i,j}) = \begin{cases} \frac{(x_{i,j}-x_{maxj})(x_{i,j}-x_{minj})^{n_j}}{(x_{i,j}-x_{minj})^{n_j-1}((x_{optj}-x_{minj})(x_{i,j}-x_{optj})-(x_{optj}-x_{maxj})((n_j-1)x_{optj}+x_{minj}-n_jx_{i,j}))}, & \text{se } x_{minj} < x_{i,j} < x_{maxj} \\ 0, & \text{caso contrário} \end{cases} \quad (4)$$

em que $x_{i,j}$ é um termo genérico para as variáveis ambientais indexado conforme já descrito. O crescimento apenas ocorre se a variável ambiental em questão estiver entre os valores *min* e *max* (valores cardinais). Quando $j=1$, n_j assume valor 2 e para as demais variáveis 1.

Em cada i instante de tempo o parâmetro de interação ξ_i é uma função do parâmetro adimensional ψ_i (LE MARC *et al.*, 2002) calculado de acordo com:

$$\xi_i = \begin{cases} 1, & \text{se } \psi_i \leq 0,5, \\ 2(1 - \psi_i), & \text{se } 0,5 < \psi_i < 1, \\ 0, & \text{se } \psi_i > 1 \end{cases} \quad (5)$$

sendo ψ , por sua vez calculado em função de $\varphi(\gamma)$:

$$\psi_i = \sum_k \frac{\varphi(\gamma_{i,j})}{2 \prod_{j \neq k} \varphi(\gamma_{i,j})} \text{ tal que } k \in j \quad (6)$$

e

$$\varphi(\gamma_{i,j}) = \begin{cases} (1 - \gamma_{i,j})^3, & \text{se } j = 2, j = 3 \\ (1 - \sqrt{\gamma_{i,j}})^3, & \text{se } j = 1 \end{cases} \quad (7)$$

Com base nos parâmetros estimados e resolvendo a equação diferencial (3) temos que o logUFC/g de *S. enterica* resultante do crescimento (N_i) é dado por:

$$N_i = N_0 e^{\mu_{opt} \prod_j^3 \gamma_{i,j} \xi_i t_i}, \quad (8)$$

sendo t o i -ésimo período de tempo em horas de exposição à dada combinação das variáveis ambientais.

Modelo de inativação de Salmonella enterica

O modelo de inativação Weibull proposto por Coroller *et al.* (2006), demonstra que em condições dinâmicas a taxa de inativação pode ser descrita por:

$$\frac{dN_k}{dt} = p\delta_k^{-p}t^{p-1} \quad (9)$$

onde t é o tempo em horas de exposição aos fatores ambientais para a k -ésima cepa modelada, p é um parâmetro adimensional de forma fixado em 2,27 (COROLLER *et al.*, 2015) e δ_k é a redução decimal da k -ésima cepa. Neste caso, foram consideradas duas subpopulações, sendo então $k=1$ subpopulação mais sensível e $k=2$ subpopulação mais resistente. Desta forma, aplicando a equação (9) a duas subpopulações, temos que a concentração de *Salmonella enterica* em logUFC/g no i -ésimo intervalo de tempo (i.e. condições dinâmicas) de duração t é dado por:

$$\log(N(t_i)) = \log(N_0) - \log(1 + 10^\alpha) - \log\left(10^{\left(\frac{t_i}{\delta_{1i}}\right)^p + \alpha} 10^{\left(\frac{t_i}{\delta_{2i}}\right)^p}\right) \quad (10)$$

onde α é um parâmetro que relaciona a fração (f) da subpopulação 1 na população, sendo calculado como:

$$\alpha = \log\left(\frac{f}{1-f}\right) \quad (11)$$

De acordo com o conceito gamma para inativação temos que o efeito das k -ésimas variáveis ambientais $\theta(x_{i,k})$ é incorporado a cada i ésimo intervalo de tempo em cada j subpopulação por:

$$\log(\delta_{i,j}) = \log(\delta^*_j) - \sum_k \log(\theta(x_{i,k})) \quad (12)$$

e δ^*_j é a resistência de cada subpopulação em condições ótimas de sobrevivência. Nas funções $\theta(x_{i,k})$, x é um termo genérico que se refere às variáveis ambientais de acordo com o índice k :

para Aw:

$$\log \theta(aW_i) = \left(\frac{aW_i - aW_{opt}}{Z_{aW}} \right)^2 \quad (13)$$

para o pH:

$$\log \theta(pH_i) = \left(\frac{pH_i - pH_{opt}}{Z_{pH}} \right)^3 - \left(\frac{pH^* - pH_{opt}}{Z_{pH}} \right)^3 \quad (14)$$

e para a temperatura:

$$\log \theta(T_i) = \begin{cases} \frac{2(T_c - T_{opt})(T_i - T^*)}{Z_T^2}, & \text{se } T_i \leq T_c \\ \left(\frac{T_i - T_{opt}}{Z_T} \right)^2 - \frac{(T_c - T_{opt})(2T^* - T_c - T_{opt})}{Z_T^2}, & \text{se } T_i > T_c \end{cases} \quad (15)$$

Para todas as equações de (13) a (15) os parâmetros x_k^* , x_{optk} e Z_K têm a mesma interpretação sendo x_{optk} o valor ótimo da variável k para a sobrevivência da bactéria, x_k^* valor de referência arbitrário de cada variável e Z_K é a variação da variável ambiental em relação ao x_{optk} que leva a uma redução decimal na resistência bacteriana. Para a temperatura T_c é a conexão entre a função linear e a parábola.

Os valores cardinais para inativação foram extraídos de Coroller *et al.* (2015) e estão no Quadro 3.

Quadro 3: Parâmetros ambientais e seus respectivos valores de inativação de *Salmonella Typhimurium* determinados segundo Coroller *et al.* (2015).

Fixas redução	Valores (unidade)	Descrição
ZpH1	-2,3	Variação no pH em relação ao pHopt em que há uma variação decimal na resistência bacteriana na subpopulação 1
ZpH2	-2,38	Variação no pH em relação ao pHopt em que há uma variação decimal na resistência bacteriana na subpopulação 2
pH*	6	pH de referência fixado arbitrariamente
pHopt	5,91	Valor ótimo para sobrevivência
ZaW1	0,034	Variação na aw em relação ao aWopt em que há uma variação decimal na resistência bacteriana na subpopulação 1
Zaw2	0,039	Variação na aw em relação ao aWopt em que há uma variação decimal na resistência bacteriana na subpopulação 2
aWopt	0,997	aW ótima: valor ótimo para a sobrevivência
ZT	24,1	A variação na temperatura em relação à Topt que ocasiona uma variação decimal na resistência bacteriana
T*	12	T fixada: Temperatura arbitrariamente fixada em 12°C
Tc	22	Conexão entre a função linear e a parábola
Topt	10,5	T ótima: temperatura ótima observada de sobrevivência em casos de estresse a ácidos fortes

6.10.3 Ajuste do modelo e intervalos de confiança

Os parâmetros do modelo $(\mu_{opt}, \delta_1^* \delta_2^*, \alpha)$ foram obtidos por meio da minimização dos erros quadráticos, que na premissa de normalidade dos erros maximiza a verossimilhança dos parâmetros. Os intervalos de confiança foram obtidos a partir da premissa acima por meio da técnica de perfil de verossimilhança. Para tanto foi utilizado o fato de que o Teste de Razão das Verossimilhanças (TRV) se distribui com uma distribuição χ_1^2 . Considerando a função do TRV de acordo com Coroller *et al.* (2015):

$$TRV = n(\ln(\theta_0) - \ln(\theta_1)) \quad (16)$$

Onde n é o tamanho da amostra que gerou o parâmetro, θ_1 é o parâmetro modelado e θ_0 é o limite do parâmetro em que se rejeita a hipótese nula. Com isso, invertendo a função do TRV e se utilizando dos valores críticos de uma distribuição $\chi^2_{1-\alpha,1}$ podemos saber o intervalo de confiança assintótico dos parâmetros.

6.10.4 Validação do modelo matemático

Os dados das variáveis ambientais e populacional de *S. enterica* adquiridos no estudo Validação foram inseridos no modelo matemático juntamente com os parâmetros $(\mu_{opt}, \delta_1^*, \delta_2^*, \alpha)$ ajustados encontrados a partir dos dados do estudo Base.

6.10.5 Aplicação do modelo em um típico cenário brasileiro

O cenário brasileiro de concentração inicial bacteriano é diferente do que foi utilizado para aplicação do modelo matemático. Para testar a eficiência da fermentação e dessecação em condições típicas, o modelo foi aplicado a partir de concentrações iniciais relatados por Mürmann, Santos e Cardoso (2009). Esta concentração inicial foi considerada como incerteza no modelo e implementada como uma distribuição empírica discreta de probabilidades conforme a Tabela 1. O modelo estocástico foi simulado com valor médio de 10000 iterações no software @Risk 6.1.1.

Tabela 1. Distribuição de probabilidades da concentração inicial de *Salmonella enterica* em salames.

Número de amostras	LogNMPg ⁻¹ (pto mediano)	Probabilidade
22	-1,19	36,07%
31	-0,26	50,82%
2	0,74	3,28%
4	1,74	6,56%
2	2,45	3,28%

7. RESULTADOS

7.1 Crescimento em pH 5 de *Salmonella enterica* sorovares Derby, Infantis e Typhimurium.

O teste de desempenho das 32 cepas oriundas da bacterioteca do Setor de Medicina Veterinária Preventiva cultivadas em caldo BHI pH 5, demonstrou médias de crescimento, após 18 horas, entre 6,97 a 7,15 UFC.mL⁻¹, quando testadas em *mix* de quatro bactérias (Tabela 2). Após a realização desta triagem, foram escolhidos para serem testados individualmente os *mix* de número um, seis, oito (cepas oriundas de linguiça frescal; sorovares Derby, Typhimurium e Infantis, respectivamente) e o *mix* de número sete (cepas oriundas de salame, sorovar Typhimurium), pois apresentaram as maiores médias de crescimento. Quando as cepas foram testadas individualmente, estas apresentaram crescimento de <1 UFC.mL⁻¹ a 7,18 log UFC.mL⁻¹.

Tabela 2: Enumeração após cultivo (37°C/24 h) em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) pH 5 de 32 cepas de *Salmonella enterica* pertencentes à bacterioteca do Setor de Medicina Veterinária Preventiva, testadas em *mix* de quatro cepas e individualmente.

Identificação bacterioteca	Origem	Sorovar	Identificação <i>Mix</i>	Enumeração <i>Mix</i> (log UFC.mL ⁻¹)	Enumeração individual (log UFC.mL ⁻¹)
3	LF	Derby	1		6,76
761	LF	Derby	1	7,11	6,67
764	LF	Derby	1		7,09
775	LF	Derby	1		6,81
781	LF	Derby	2		Não testada
787	LF	Derby	2	6,99	Não testada
791	LF	Derby	2		Não testada
1065	LF	Derby	2		Não testada
1066	LF	Derby	3		Não testada
1075	LF	Derby	3	7,10	Não testada
1077	LF	Derby	3		Não testada
1089	LF	Derby	3		Não testada
762	LF	Typhimurium	4		Não testada
771	LF	Typhimurium	4	6,97	Não testada
776	LF	Typhimurium	4		Não testada
778	LF	Typhimurium	4		Não testada
1001	LF	Typhimurium	5		Não testada
1012	LF	Typhimurium	5	7,05	Não testada
1039	LF	Typhimurium	5		Não testada
1043	LF	Typhimurium	5		Não testada
1048	LF	Typhimurium	6		6,88
1054	LF	Typhimurium	6	7,11	Sem crescimento
1057	LF	Typhimurium	6		1,92
1061	LF	Typhimurium	6		1,82
1	S	Typhimurium	7		6,50
3	S	Typhimurium	7	7,15	4,58
7	S	Typhimurium	7		6,88
10	S	Typhimurium	7		3,90
7	LF	Infantis	8		7,18
751	LF	Infantis	8	7,04	Sem crescimento
752	LF	Infantis	8		6,08
758	LF	Infantis	8		7,12

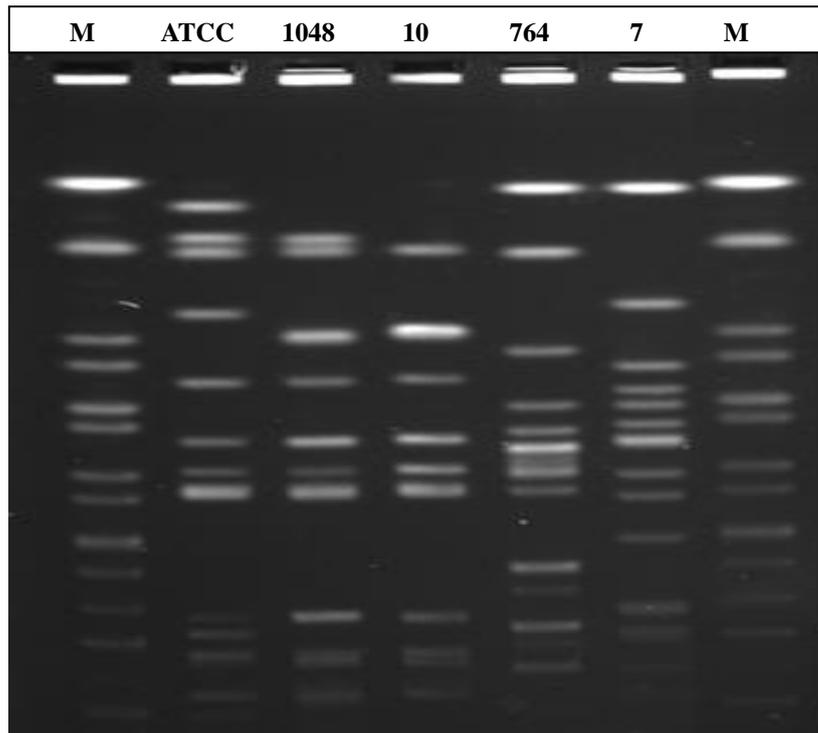
LF: Linguiça Frescal, S: Salame

Por atingirem maior população após o cultivo em BHI pH 5, as cepas número 7 de *S. Infantis* (isolada de linguiça frescal) e 764 de *S. Derby* (isolada de linguiça frescal) foram escolhidas para compor o coquetel de cepas a ser inoculado na massa para preparo dos salames. O perfil de macrorrestrição (PFGE) das referidas cepas foi determinado e consta na Figura 7.

Para a escolha das cepas do sorovar Typhimurium, todas aquelas pertencentes aos *mix* 6 e 7 que apresentaram crescimento em BHI pH 5, foram submetidas ao PFGE. A partir dos perfis dessas cepas, em comparação com *S. Typhimurium* ATCC 14028, foram

escolhidas as cepas número 1048 (isolada de linguiça frescal) e 10 (isolada de salame) para serem incluídas no coquetel de sorovares de *S. enterica*. Todas as cepas apresentaram entre si ao menos uma banda de diferença no perfil de PFGE (Figura 7).

Figura 7: Perfis de macrorrestrrição após clivagem com XbaI de cepas escolhidas para comporem o coquetel de *Salmonella enterica* a ser inoculado nos salames.



M: *Salmonella* Branderup H9812; ATCC: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; 1048: *Salmonella* Typhimurium oriunda de linguiça frescal; 10: *Salmonella* Typhimurium oriunda de salame; 764: *Salmonella* Derby oriunda de linguiça frescal e 7: *Salmonella* Infantis oriunda de linguiça frescal.

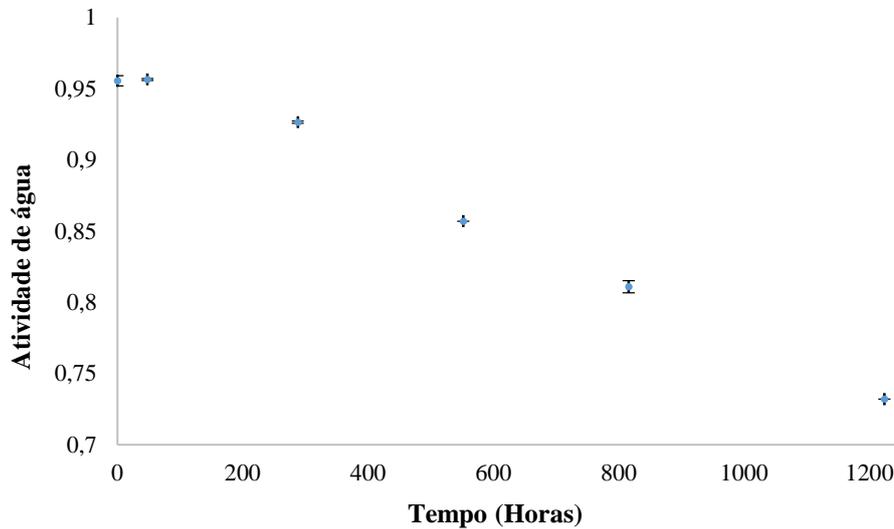
7.2 Estudo Piloto

A receita utilizada, a câmara de maturação e o protocolo de maturação previamente estabelecido (25°C na fermentação e 18°C na dessecação com diminuição gradativa da UR do ar) foi exequível (Apêndice C) e possibilitou a elaboração de 70 salames.

A duração da maturação foi dependente do protocolo de temperatura pré-estabelecido, da população de *S. enterica* inicial, velocidade de inativação e do número de salames elaborados. Por isso, a duração do estudo Piloto foi de 1238 horas (51,6 dias). A fermentação, primeira etapa da maturação, ocorreu durante 47 horas a 25°C, quando o pH dos salames baixou de 6,05 para 5,36, sinalizando o término dessa etapa e início da fase seguinte. A dessecação, que teve a duração de 1.191 horas, na temperatura de aproximadamente 18°C, possibilitou uma queda do pH até 4,79 nas primeiras 534 horas, seguido por um aumento até pH 5,30 ao final do estudo.

A primeira unidade amostrada no estudo Piloto apresentou A_w 0,9555 na hora zero e decresceu até 0,732 após 1224 horas de maturação, apresentando uma média de redução diária de 0,0043 na A_w . A partir da construção do gráfico de A_w (Figura 8), determinou-se que cinco pontos de amostragem, com intervalo de 12 dias, seriam suficientes para determinação da queda de A_w no estudo Base. Dessa forma, as amostragens foram definidas para serem conduzidas nas horas zero, 288, 576, 864 e 1152 de maturação.

Figura 8: Média e desvio padrão das análises de atividade de água de unidades amostrais durante 1224 horas de maturação no estudo Piloto.

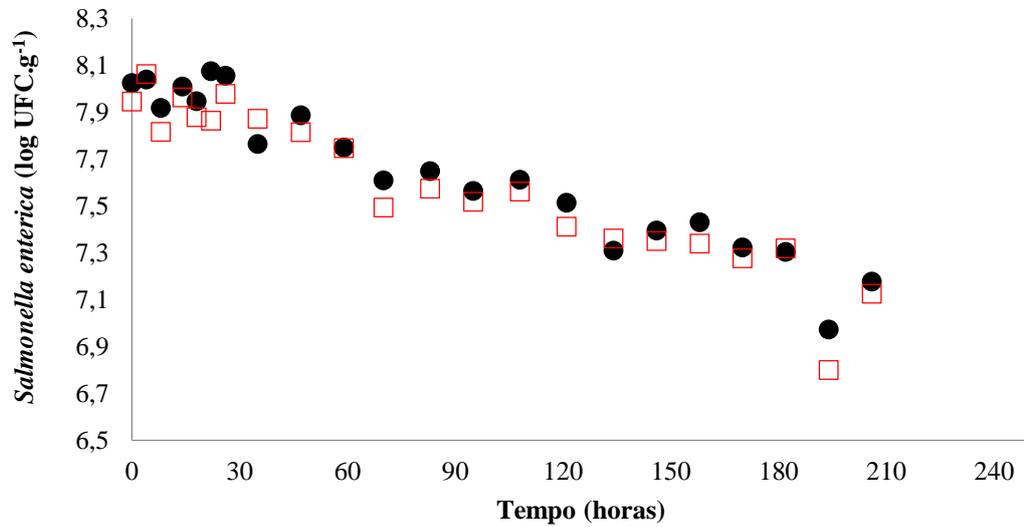


Os dados de comportamento de *S. enterica* eram desconhecidos e, por isso, foram realizadas 32 amostragens (conforme descrito no item 6.6) ao longo de 1238 horas. A comparação entre as médias de contagens em ágar XLD e TAL apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), em que o meio de cultura TAL apresentou uma média total de crescimento/recuperação de $0,08 \text{ UFC.g}^{-1} S. enterica$ maior quando comparado ao ágar XLD.

As primeiras unidades amostrais apresentaram concentração inicial de 7,94 e 8,03 log UFC.g⁻¹ de *S. enterica* em ágar XLD e TAL, respectivamente. O intervalo de quatro e seis horas de amostragem realizado nas primeiras 24 horas demonstrou um aumento de 0,03 log UFC.g⁻¹ de *S. enterica* em ambos meios de cultura XLD e TAL. A partir desse momento a população começou a declinar (Figura 9). O protocolo inicial de quatro e seis horas, arbitrariamente determinado, foi capaz de identificar o comportamento bacteriano e, portanto, deveria ser adotado nos estudos posteriores.

Das 25 horas até 206 horas de estudo, as amostragens foram realizadas com intervalos de 12 horas, quando houve uma pequena diminuição da população bacteriana de 0,92 e 0,87 log UFC.g⁻¹ no ágar XLD e TAL, respectivamente (Figura 9).

Figura 9: Média de quantificação de *Salmonella enterica* em unidades amostrais contaminadas da hora zero até 206 horas de maturação no estudo Piloto.

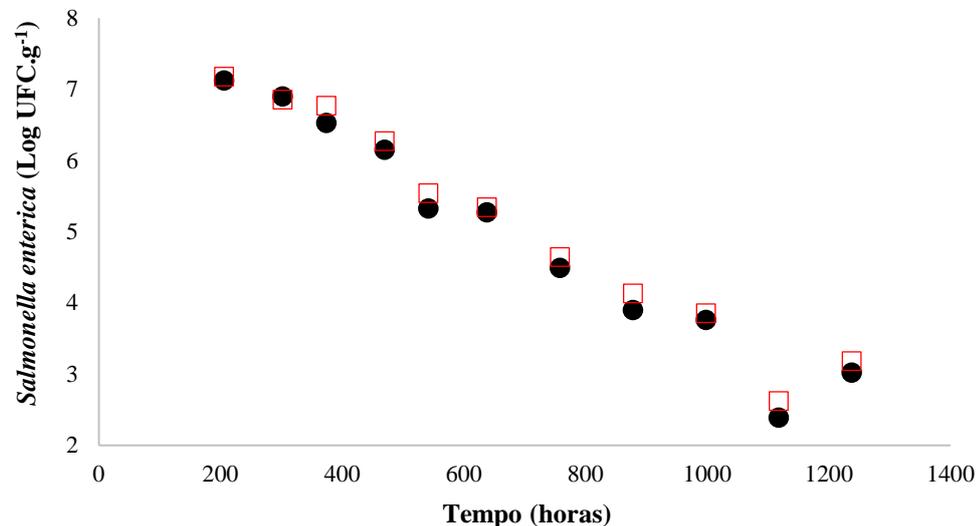


- Média das contagens de *Salmonella enterica* de unidades amostrais coletadas na área A e B realizada em ágar TAL.
- Média das contagens de *Salmonella enterica* de unidades amostrais coletadas na área A e B realizada em ágar XLD.

Como o intervalo de amostragem era determinado a partir da leitura das placas de XLD e TAL da enumeração do dia anterior, ao observar o pequeno decréscimo até as 206 horas do estudo Piloto, houve uma ampliação nos intervalos de coletas posteriores. Assim, um intervalo arbitrariamente definido de 72 horas alternado com 96 horas foi realizado no período de 207 a 638 horas, o que possibilitou a visualização do decréscimo populacional de 1,72 e 1,83 log UFC.g⁻¹ em ágar XLD e TAL, respectivamente (Figura 10).

Para prolongar a observação da curva de inativação bacteriana, um intervalo de 120 horas passou a ser realizado, no período de 639 a 1238 horas, em que foi observado um decréscimo de 2,25 e 2,16 log UFC.g⁻¹ no ágar XLD e TAL, respectivamente (Figura 10). Assim, o estudo Piloto completou 51,6 dias de maturação, período em que houve uma redução populacional total de *S. enterica* na ordem de 4,92 e 4,84 log UFC.g⁻¹ nas análises realizadas em ágar XLD e TAL, respectivamente.

Figura 10: Média de quantificação de *Salmonella enterica* em unidades amostrais contaminadas das áreas A e B, da hora 206 até 1238 horas de maturação no estudo Piloto.



- Média das contagens de *Salmonella enterica* de unidades amostrais coletadas na área A e B realizada em ágar XLD.
- Média das contagens de *Salmonella enterica* de unidades amostrais coletadas na área A e B realizada em ágar TAL.

Dentre as 40 colônias analisadas pelo PFGE ao final do período de maturação, todos os perfis de macrorrestrição das cepas inoculadas foram identificados, exceto *S. Derby*. Por isso, as demais colônias também foram submetidas à análise de PFGE para confirmar a inexistência de colônias de *S. Derby*, nas placas de ágar XLD e TAL: 36 colônias de *S. Typhimurium* (12 de *S. Typhimurium* ATCC 14028; 12 de *S. Typhimurium* 10 e 12 de *S. Typhimurium* 1048); 32 colônias de *S. Infantis* e duas colônias de *S. Derby*. Assim, confirmou-se que todas as cepas de *S. enterica* do coquetel inoculado nos salames sobreviveram à maturação.

Embora ainda houvesse contagem microbiana, de aproximadamente 3 log UFC.g⁻¹ de *S. enterica* em ambos os meios de cultura, nos últimos salames amostrados, o aspecto ressecado e descaracterizado do embutido sinalizava que o estudo Base deveria ter 48 dias de duração.

Observando a curva de inativação de *S. enterica*, determinaram-se os intervalos de coleta de amostra, conforme Quadro 4. Para cumprir o plano de amostragem, seriam necessárias 50 unidades amostrais contendo o coquetel de *S. enterica* e cinco unidades amostrais para análise de *A_w*.

Quadro 4: Intervalo de amostragem em relação ao tempo de maturação do salame e número de unidades amostrais a ser colhido para quantificação de *Salmonella enterica* e para análise de atividade de água.

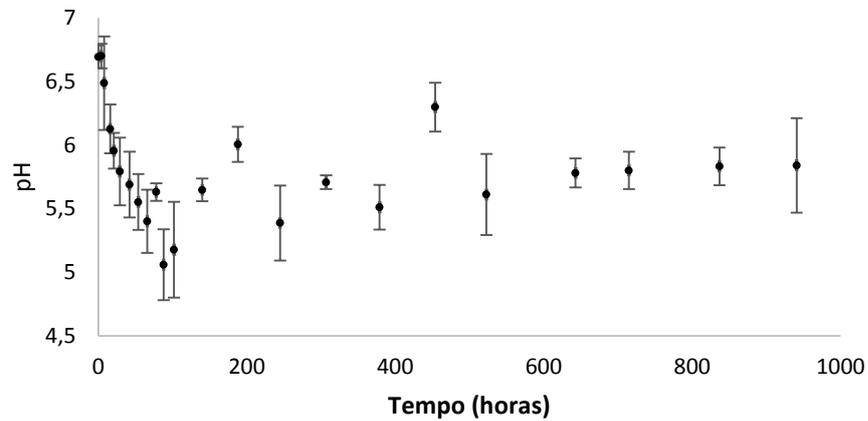
Quantificação de <i>Salmonella enterica</i>			Análise de atividade de água (Aw)	
Tempo de maturação em horas	Intervalo entre amostragens (horas)	Total de unidades amostrais a serem colhidas no período	Tempo de maturação	Número de unidades amostrais
0-24	4	12	Hora 0	1
25-96	12	12		
97-240	48	6		
241-576	72	10	Horas 288 e 576	2
577-1152	120	10	Horas 864 e 1152	2

7.3 Estudo Base

No estudo Base, a maturação dos salames ocorreu durante 941 horas (39 dias). A fermentação ocorreu nas primeiras 66 horas, quando houve a queda do pH seguida da etapa de secagem que ocorreu durante 875 horas. A temperatura e UR do ar medida nesse período encontra-se no Apêndice C.

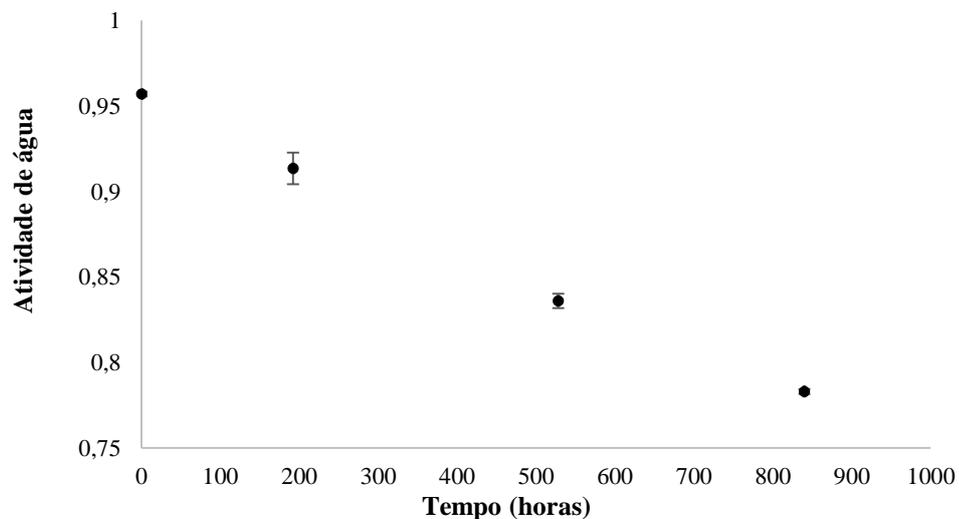
A evolução do pH dos salames contaminados está demonstrada na Figura 11. Nas primeiras 66 horas, o pH decresceu de 6,69 para 5,4, indicando a acidificação do ambiente pela ação de bactérias ácido lácticas e o término da fase de fermentação. O pH ainda decresceu até 5,05 até as 88 horas, elevando-se a 5,84 ao final da maturação.

Figura 11: Média e desvio padrão do pH das unidades amostrais em 23 colheitas de amostras durante 941 horas de maturação do salame no estudo Base.



A análise de A_w estava prevista para ser realizada em cinco salames; entretanto, na última análise programada (1152 horas), não havia mais detecção de colônias nos meios sólidos e, por isso, esta não foi realizada (Figura 12).

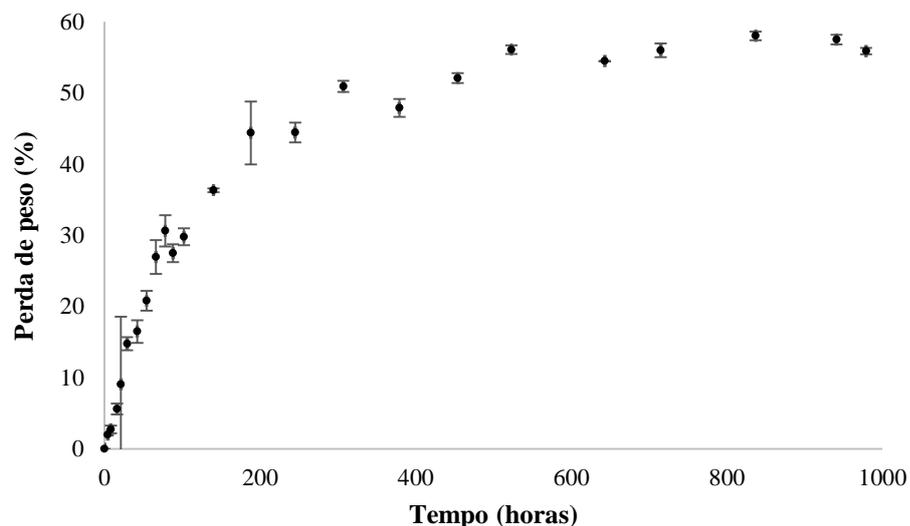
Figura 12: Média e desvio padrão de atividade de água das unidades amostrais em quatro pontos de amostragem durante 840 horas de maturação do salame no estudo Base.



Com a análise por equação diferencial dos valores adquiridos nos quatro pontos amostrados foi possível determinar a A_w a cada hora durante a maturação. Assim, ao início do processamento a A_w dos salames era de 0,9570 na hora zero; 0,9417 na hora 66 (início da dessecação); 0,9141 na hora 188; 0,8699 na hora 391 e 0,7607 na hora 941, representando um decréscimo médio diário de 0,0050 na A_w .

O salame atingiu o limite máximo permitido de 0,90 de A_w nas 252 horas (10,5 dias) de maturação, embora a perda de peso de 40% tenha ocorrido entre 140 e 188 horas (Figura 13).

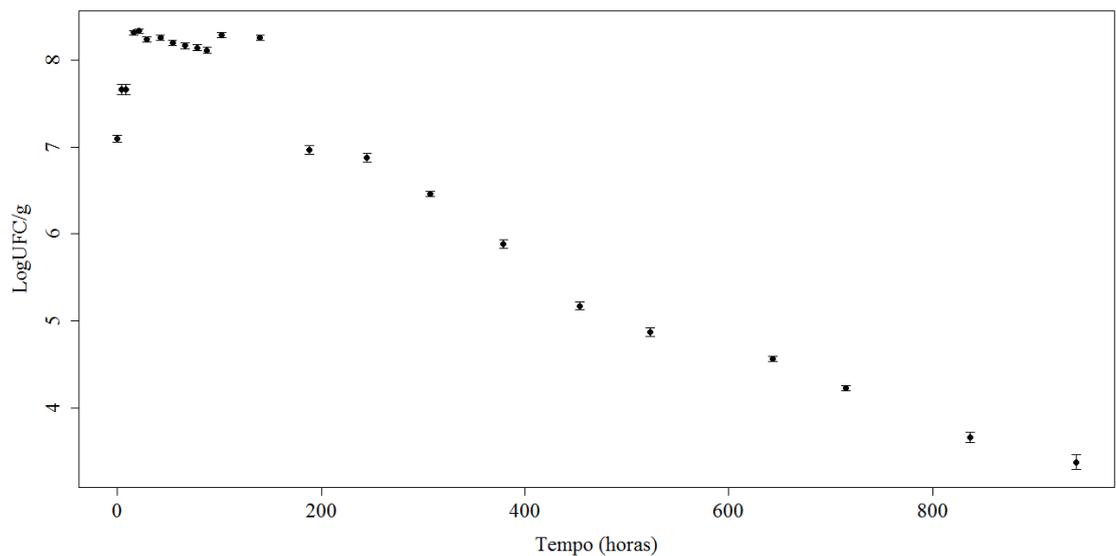
Figura 13. Média e desvio padrão da perda de peso das unidades amostrais em 23 colheitas de amostra durante 941 horas de maturação do salame no estudo Base.



O comportamento de *S. enterica* foi determinado em 23 colheitas de amostra, quando o limite para capacidade de detecção da metodologia de enumeração foi alcançado. Para a análise Bayesiana, foram utilizados os dados de contagem bacteriana do ágar TAL, pois o mesmo apresentou uma média de recuperação de *S. enterica* 0,14 log UFC.g⁻¹ superior em comparação ao ágar XLD (p<0,005). A primeira amostragem (hora zero) das unidades de salame contaminadas, resultou em população inicial de aproximadamente 7,09 log UFC.g⁻¹ de *S. enterica*. A maior concentração observada foi de 8,33 log UFC.g⁻¹ em 21 horas de fermentação e, após esse período, a população bacteriana apresentou declínio médio de 0,0054 log UFC.g⁻¹ por hora. No início da dessecação (hora 66) a população era de 8,16 log UFC.g⁻¹ e continuou decrescendo até 3,37 log UFC.g⁻¹ na última amostragem

(hora 941). As cadeias geradas com a inferência Bayesiana convergiram com cerca de 5000 iterações (dados não mostrados) e os intervalos de credibilidade (CrI 95%) foram estreitos durante toda a curva (Figura 14).

Figura 14: Média de quantificação de *Salmonella enterica* em unidades amostrais contaminadas, durante 941 horas de maturação do salame no estudo Base, a partir da inferência Bayesiana.



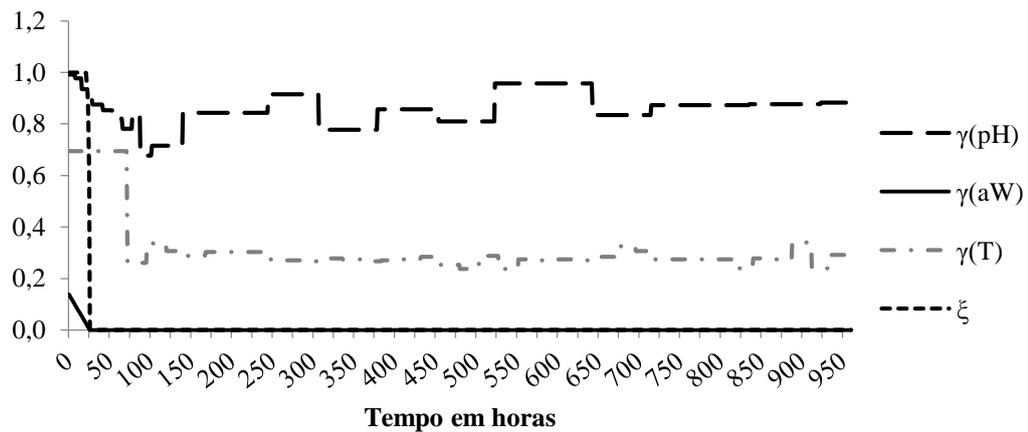
Amostragens posteriores a 941 horas de maturação, na hora 977 e 1013 não foram consideradas na curva de comportamento bacteriano, pois a concentração de *S. enterica* nos salames estava abaixo do limite de detecção do método empregado ($<100 \text{ UFC.g}^{-1}$), embora os salames ainda estivessem positivos para *S. enterica* pelo método qualitativo.

7.3.1 Interface de crescimento e inativação de *Salmonella enterica* durante a maturação do salame.

Com a aplicação do modelo matemático descrito por Coroller *et al.* (2015) observou-se que os valores de temperatura de 20°C a 30°C modelados permaneceram dentro dos valores dos parâmetros cardinais limites de crescimento ($<5,06^\circ\text{C}$ e $>46,48^\circ\text{C}$). Da mesma forma, o pH que variou entre 5,05 a 6,69, também não ultrapassou os valores limites cardinais ($<3,58$ e $>10,42$). Diferentemente, a A_w teve uma variação de 0,9565 a 0,7607, ultrapassando o valor limite cardinal de crescimento (1 a 0,951) e iniciando a

inativação bacteriana. Por isso, a influência da A_w foi fundamental para determinar o momento em que a bactéria deixou de crescer e iniciou sua inativação. Em, aproximadamente, 26 horas com A_w de 0,9507 o parâmetro $\gamma(aW)$ declinou a zero, interrompendo o crescimento bacteriano e iniciando a inativação (Figura 15).

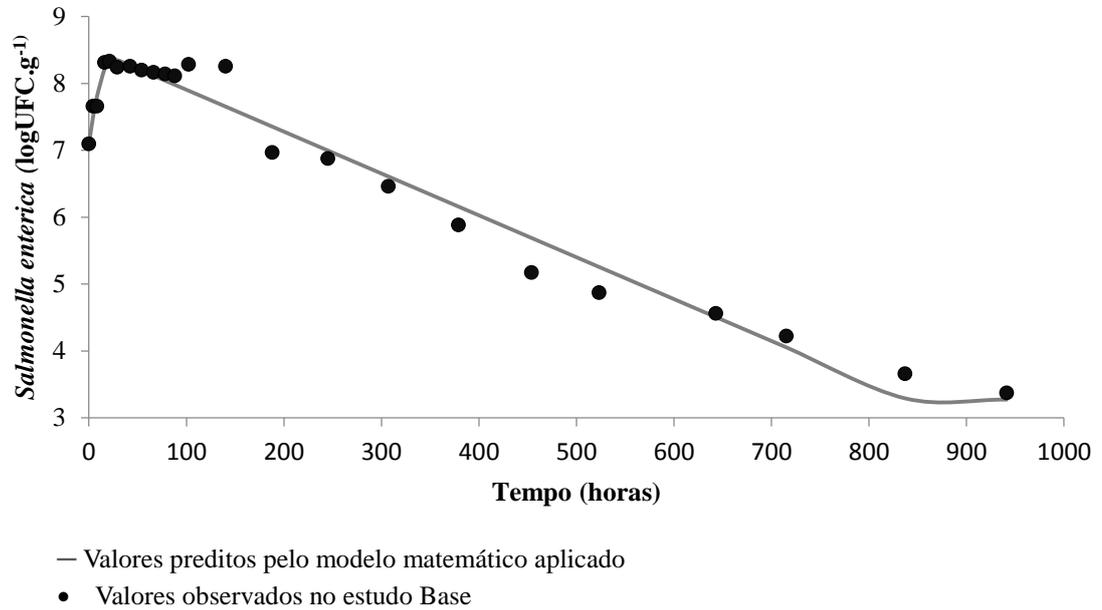
Figura 15: Valores das variáveis ambientais ($\gamma_{i,j}$) e ξ no crescimento de *Salmonella enterica*.



7.3.2 Estimação dos parâmetros e ajuste do modelo.

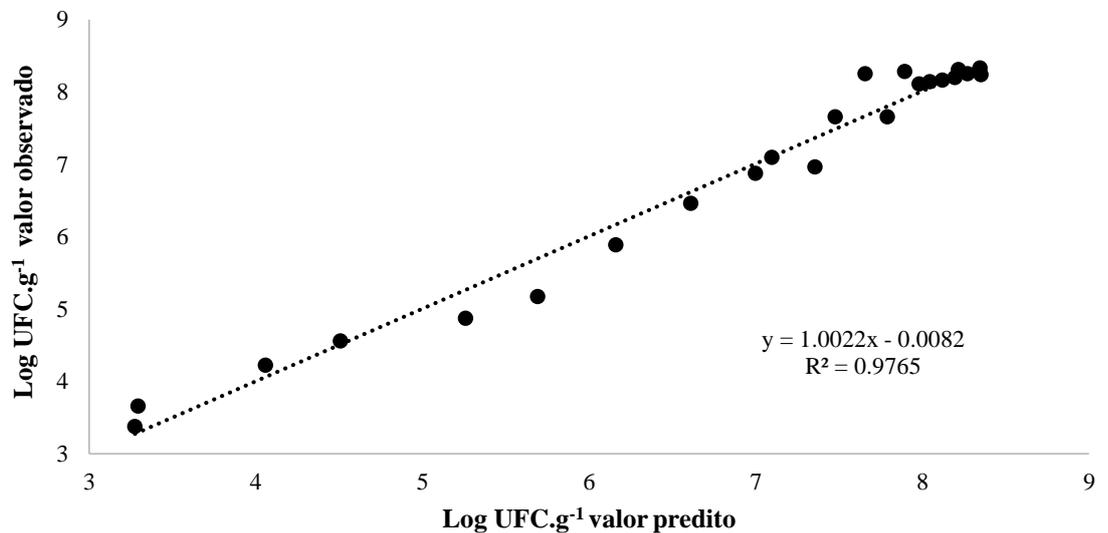
A inserção dos dados de crescimento e inativação da população bacteriana com os valores das variáveis ambientais, ajustadas no modelo matemático, determinaram os parâmetros (95% IC) de $\mu_{opt}(h^{-1}) = 2,54558 (2,54540 - 3,03)$, $\delta_1^*(h) = 1588,06 (1587,99 - 1891,68)$, $\delta_2^*(h) = 163299,72 (163292,80 - 194520,80)$ e $\alpha = 0,02158 (0,02157 - 0,02571)$. Os resultados preditos ficaram bem ajustados aos observados, com soma dos erros quadráticos de 1,47. Foi possível prever o crescimento populacional, o “ombro” formado no ápice da curva, a queda da população e a concavidade ao final da mesma para ajustar à redução da taxa de inativação bacteriana (Figura 16).

Figura 16: Curva do comportamento de *Salmonella enterica* observada no estudo Base e a curva predita pelo modelo matemático aplicado.



A dispersão calculada por regressão linear dos valores observados em relação aos valores preditos evidenciou que 97,65% da variação desses valores puderam ser explicados pelos preditos ($R^2 = 0,9765$ na Figura 17). Além disso, a equação da reta mostrou uma inclinação próxima a um (1,0022) e o intercepto próximo de zero (0,0082) (Figura 17).

Figura 17: Gráfico de dispersão e equação da reta dos valores de crescimento e inativação de *Salmonella enterica* observados no estudo Base comparado aos valores preditos.

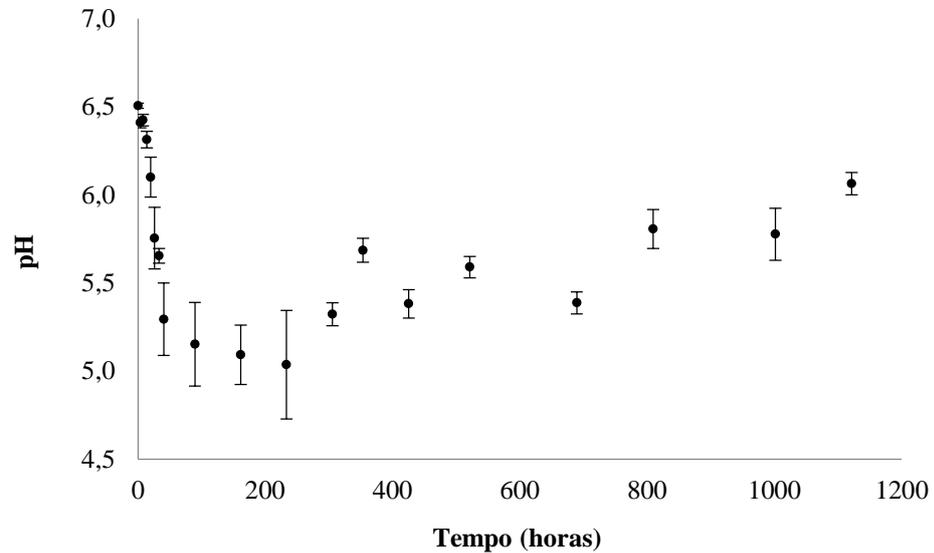


7.4 Estudo Validação

Cinco quilos de massa cárnea foram preparados para a elaboração de 27 salames. Vinte e um salames inoculados com aproximadamente 8 log UFC.g⁻¹ de *S. enterica* corresponderam a pontos de amostragem microbiológica e de pH e os outros seis corresponderam a pontos de amostragem de Aw durante a maturação.

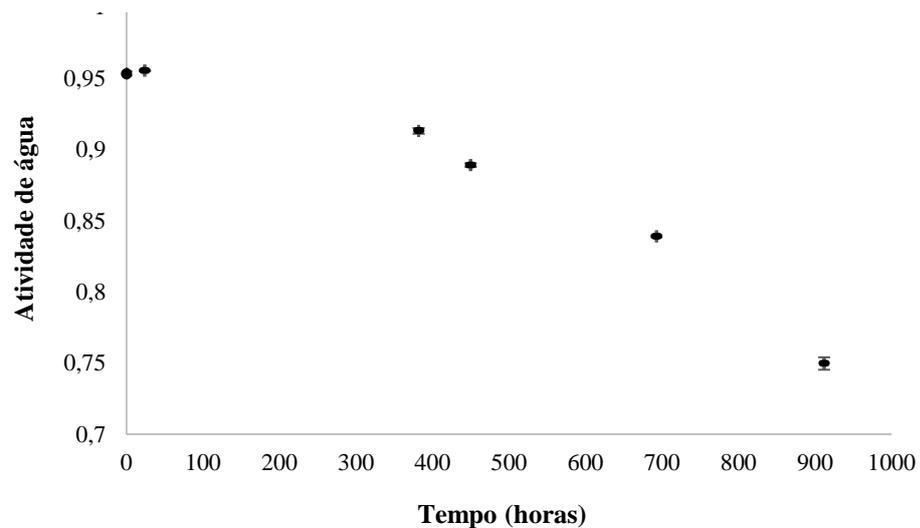
A fermentação dos salames ocorreu durante 48 horas. No início da maturação o pH encontrava-se em 6,5; o qual decresceu até 5,29, valor determinado para o início da dessecação. Após o início da dessecação, o pH do salame continuou decrescendo até 5,04 nas 233 horas e aumentou até 6,06 quando a dessecação foi encerrada na hora 1121,5 (Figura 18). Assim, o estudo Validação teve duração de 46 dias. A temperatura e a UR do ar foram aferidas diariamente na câmara de maturação (Apêndice C).

Figura 18: Média e desvio padrão do pH das unidades amostrais em 21 pontos de amostragem durante 1121,5 horas de maturação no estudo Validação.



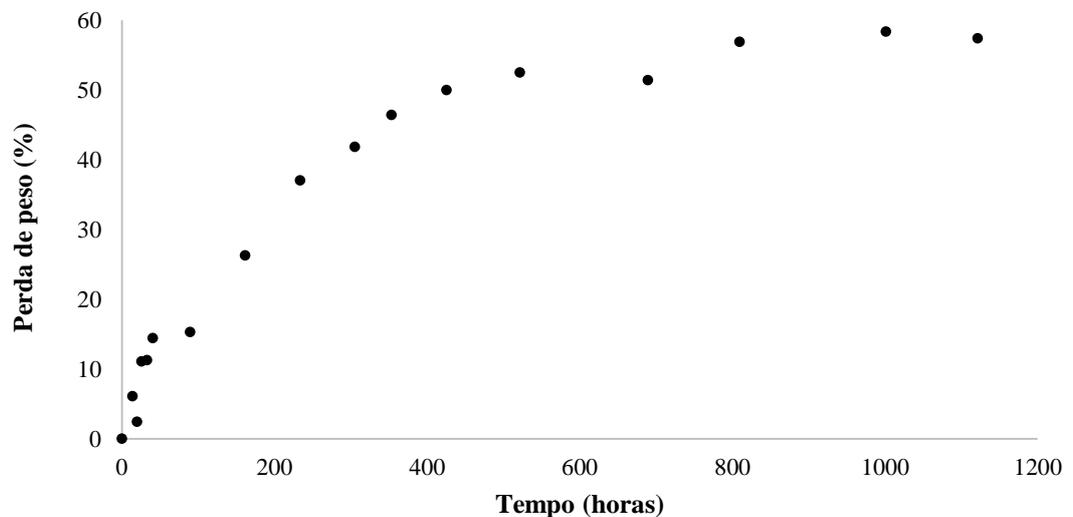
A A_w foi aferida em seis momentos da maturação (Figura 19) e determinada em 1121 pontos/ hora a partir de equação diferencial.

Figura 19: Média e desvio padrão da atividade de água das unidades amostrais em seis colheitas de amostra durante 912 horas de maturação do salame no estudo Validação.



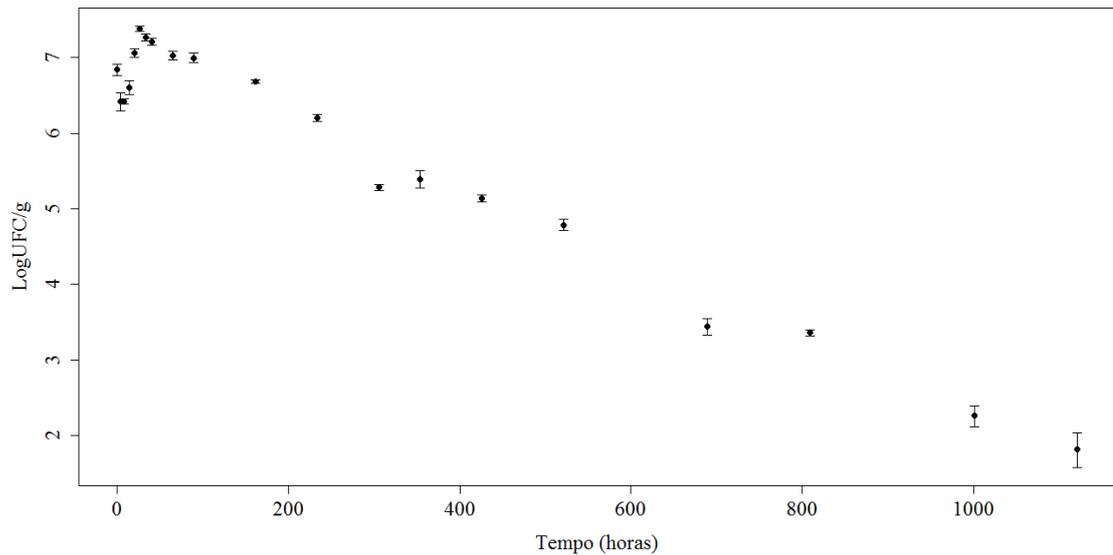
Os salames apresentaram A_w : 0,9555 na hora zero; 0,9455 ao início da dessecação; 0,8999 nas 286 horas; 0,8698 nas 450 horas e 0,7568 ao final de 1121 horas de maturação. A perda diária de A_w foi calculada em 0,0042. A perda de peso de 40% foi observada entre as 233 e 305 horas (Figura 20).

Figura 20. Perda de peso das unidades amostrais em 17 colheitas de amostra durante 1121,5 horas de maturação do salame no estudo Validação.



A primeira amostragem (hora zero) dos salames contendo o coquetel de *S. enterica* demonstrou uma contaminação inicial de aproximadamente $6,83 \log \text{UFC.g}^{-1}$, alcançando $7,37 \log \text{UFC.g}^{-1}$ em 26 horas de fermentação. Após esse período, a população bacteriana começou a diminuir em média $0,0052 \log \text{UFC.g}^{-1}$ por hora. No início da dessecação (hora 48) a população era de aproximadamente $7,20 \log \text{UFC.g}^{-1}$ e continuou decrescendo até $1,82 \log \text{UFC.g}^{-1}$, quando foi realizada a última amostragem (hora 1121,5). As cadeias geradas com a inferência Bayesiana convergiram com cerca de 5000 iterações (dados não mostrados) e os intervalos de credibilidade (CrI 95%) foram estreitos durante toda a curva, exceto ao final desta, devido à maior variabilidade na contagem bacteriana (Figura 21).

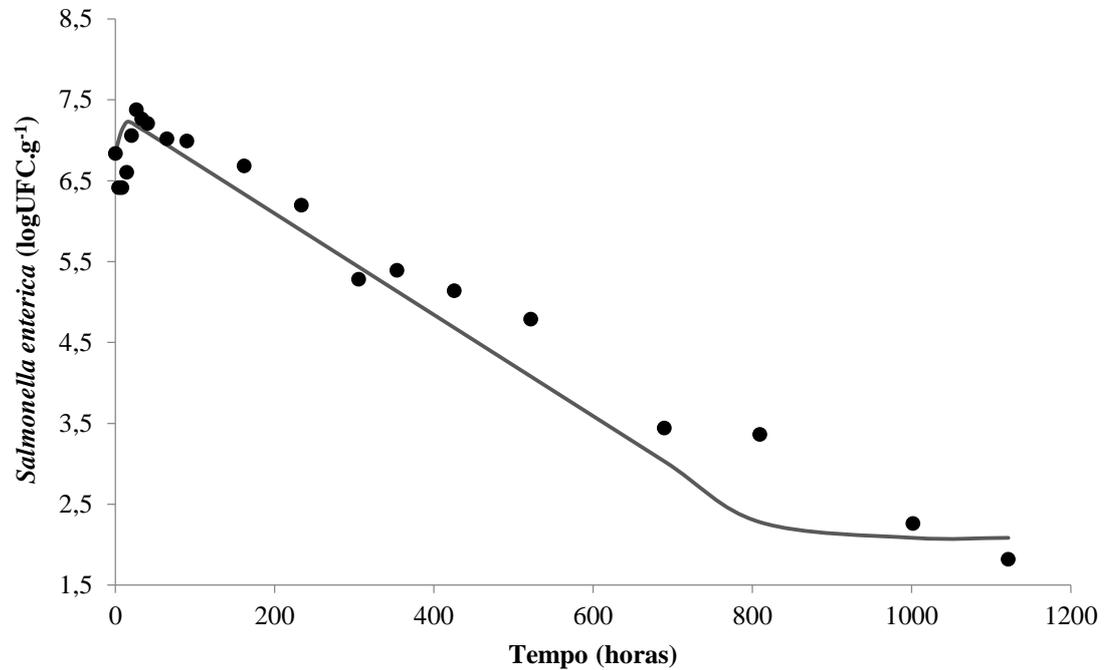
Figura 21: Média de concentração de *Salmonella enterica* em unidades amostrais contaminadas, durante 1121,5 horas de maturação do salame no estudo Validação, a partir da inferência Bayesiana.



7.4.1 Ajuste e validação do modelo

Os parâmetros ajustados de μ_{opt} , δ_1^* , δ_2^* e α obtidos no estudo Base foram utilizados para a validação do modelo matemático. O modelo matemático construiu uma curva predita que se ajustou à curva observada tanto no crescimento e inativação bacteriana, quanto na formação do ombro no ápice da curva, embora esse tenha apresentado uma falha na predição da cauda onde a concentração ($\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$) teve maior variabilidade (Figura 22).

Figura 22. Curva do comportamento de *Salmonella enterica* observada no estudo Validação e a curva predita pelo modelo matemático aplicado.

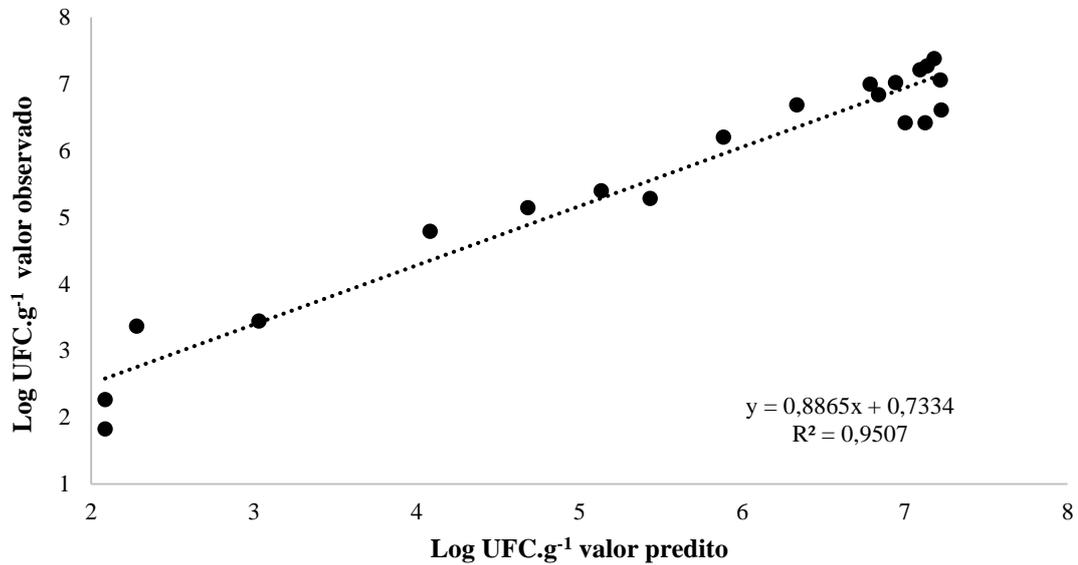


— Valores preditos pelo modelo matemático aplicado.

• Valores observados no estudo Validação.

A soma dos erros quadráticos foi 3,86 e a regressão linear (valores observados vs preditos) demonstrou que 95% da variação nos valores observados puderam ser explicados pelos valores preditos pelo modelo. Neste caso, a equação da reta construída ficou mais distante do modelo ideal $y=x$, com o intercepto mais distante de zero (0,7334) em relação à modelagem do estudo Base e inclinação diferente de 1 (0,8865) (Figura 23).

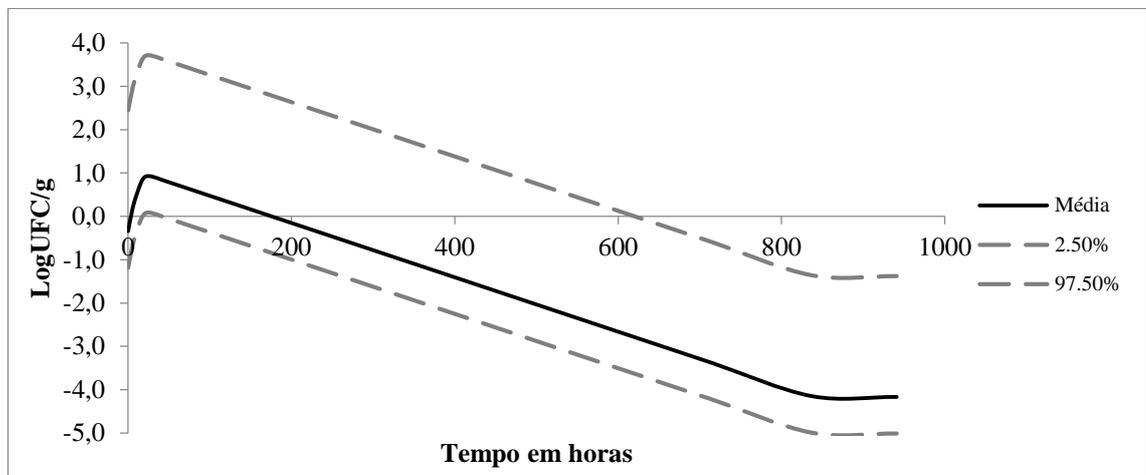
Figura 23: Gráfico de dispersão e equação da reta dos valores de crescimento e inativação de *Salmonella enterica* observados no estudo Validação comparado aos valores preditos pelo modelo matemático.



7.5 Aplicação do modelo em uma situação de incerteza na concentração inicial (logUFC.g⁻¹) de *Salmonella enterica*.

Para a aplicação do modelo para um cenário típico brasileiro, a partir de uma concentração bacteriana inicial de incerteza foi observada uma concentração média de -0,34 log UFC.g⁻¹ na hora zero, com posterior aumento até as 25 horas (0.9443 log UFC. g⁻¹), seguida de declínio. Nas 175 horas, a concentração declinou a menor que uma UFC. g⁻¹ (i.e 0 log UFC.g⁻¹) e continuou até a hora 837 quando estabilizou (Figura 24). O intervalo de confiança foi assimétrico em torno da média e a mediana apresentou valores muito próximos à média (dados não mostrados).

Figura 24. Curva do comportamento de *Salmonella enterica* observada utilizando o parâmetro de concentração inicial como incerteza.



7.6 Análise dos perfis de macrorrestrrição de *Salmonella enterica* encontrados nos salames ao final da maturação dos estudos Base e Validação.

A análise do PFGE, no estudo Base, foi realizada em dez colônias de cada meio de cultura e de cada área da câmara de maturação. Os perfis de macrorrestrrição demonstraram que todas as cepas inoculadas estavam presentes ao final da maturação: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (16/40; 40%) como a mais frequente; seguida por *S. Infantis* (11/40; 27,5%); *S. Typhimurium* 10 (9/40; 22,5%); *S. Typhimurium* 1048 (3/40; 7,5%) e *S. Derby* (1/40; 2,5%).

No estudo Validação, foram analisadas 20 colônias: a cepa mais frequente foi *S. Typhimurium* ATCC 14028 (9/20; 45%), seguida por *S. Infantis* (4/20; 20%), *S. Typhimurium* 10 (3/20; 15%), *S. Derby* (2/20; 10%) e *S. Typhimurium* 1048 (1/20; 5%). Além desses, um isolado de *S. enterica* apresentou um perfil de macrorrestrrição diferente dos pulsotipos inoculados.

8 DISCUSSÃO

Na elaboração de salames, a fermentação e a dessecação são etapas necessárias para a obtenção do produto e tradicionalmente utilizadas para o controle de patógenos em produtos que não utilizam tratamento térmico (LINDQVIST; LINDBLAD, 2009). Como consequência da ausência de padronização dessas etapas, salames disponíveis no mercado varejista brasileiro podem apresentar padrões físico-químicos acima dos limites permitidos (CACCIOPOLLI *et al.*, 2006).

Pesquisas com modelagem preditiva relacionadas ao comportamento de micro-organismos patogênicos têm sido desenvolvidas para prever o seu comportamento em alimentos, entre eles os embutidos (MATARAGAS *et al.*, 2015; RUBIO *et al.*, 2018). Portanto, o modelo matemático aplicado no presente estudo pode tornar-se uma importante ferramenta para prever o comportamento de *S. enterica* em salame elaborado pela indústria brasileira. Para isso, foram mensurados parâmetros físico-químicos a partir da receita e protocolo de maturação comumente utilizados no Brasil. Os sorovares que compuseram o coquetel de *S. enterica* (*S. Derby*, *S. Typhimurium* e *S. Infantis*) foram escolhidos de acordo com a ocorrência em carne suína brasileira e com a importância na saúde pública. Dessa forma, garantiu-se maior validade externa ao estudo.

O declínio do pH durante as primeiras horas de fermentação assegurou a conversão e estabilização da cor e formação de compostos desejáveis para o sabor do salame (LÜCKE, 1994). A queda do pH próximo a 5,3, valor referente ao ponto isoelétrico da carne, foi determinante para o início da secagem dos salames, garantindo a continuidade do processo tecnológico, uma vez que é nesse momento que se inicia a migração da água para a superfície do embutido (MIRALLES; FLORES; PEREZ, 1996; CHASCO; LIZASO; BERIAIN, 1996). O período para esse declínio variou de 48 a 66 horas, corroborando com estudos em salames brasileiros, assim como o aumento do pH apresentado ao longo do processo (CICHOSKI; ZIS; FRANCESCHETTO, 2009; CAMPAGNOL *et al.*, 2011; BERTOL *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2015). Esse aumento pode ocorrer devido à produção de amônia e desenvolvimento de fungos na superfície do alimento (consequência do processo) os quais podem oxidar lactato (MAURIELLO *et al.*, 2004; CAMPAGNOL *et al.*, 2011; MARANGONI; MOURA, 2011; COROLLER *et al.*, 2015).

Durante a etapa de dessecação na elaboração do salame, a A_w diminui gradativamente e essa redução deve alcançar 0,90 segundo a legislação brasileira

(BRASIL, 2000). A abordagem não linear para perda de A_w (i.e. modelo diferencial) foi fundamental para o ajuste do modelo. Com isso foi possível determinar a A_w a cada hora durante a maturação e, assim, determinou-se que o salame atingiu o valor de $A_w < 0,90$ aos 10,5 e 11,9 dias nos estudos Base e Validação, respectivamente. Outros autores sugerem que o salame esteja finalizado ao atingir 0,87 de A_w (CAMPAGNOL *et al.* 2009). Esse valor foi alcançado após 19 dias de maturação no estudo validação, concordando com o estudo de Campagnol *et al.* (2009); enquanto que no estudo Base esse valor foi atingido aos 16 dias.

A determinação da perda de peso é uma medida que demonstra a quantidade de água eliminada do embutido durante o período de secagem, mas não garante a segurança microbiológica, pois não avalia parâmetros que limitam o crescimento bacteriano. Porém, segundo a literatura, o salame está pronto quando atinge 40% da perda de peso e, assim, deveria estar de acordo com os parâmetros limites da legislação (GOMIDE *et al.*, 1997; DE CARVALHO *et al.*, 2017). Por isso, a coleta de dados de peso do salame durante a maturação foi realizada, com o objetivo de sugerir uma relação segura de valores de perda de peso e A_w , já que o peso poderia ser um parâmetro fácil e não destrutivo para ser avaliado durante a sua elaboração. Alguns autores sugeriram que a A_w pudesse ser calculada a partir da perda de peso, pois é difícil obter informação sobre esse parâmetro na indústria (COROLLER *et al.* 2015; NOVELLI *et al.*, 2017). No presente estudo, foi observada uma relação direta entre a perda de peso e a A_w , entretanto essa relação não foi linear. No estudo Base, o peso decresceu mais rapidamente do que a perda de A_w , atingindo 40% de perda antes de alcançar 0,90 de A_w ; enquanto que no estudo Validação esta perda não foi tão acentuada. Sabe-se que há uma relação entre esses parâmetros, porém a velocidade de perda de peso parece maior que a perda de A_w quando em temperatura de maturação mais elevada. Portanto, é difícil indicar porcentagens de perda de peso relacionadas à perda de A_w , quando o salame pode ser elaborado em diferentes cenários de maturação. Roccato *et al.* (2017) em seu estudo encontraram correlação entre os parâmetros, porém consideraram insegura a predição dos valores encontrados de peso em relação à perda de A_w .

Patógenos submetidos ao estresse ambiental como a mudança de pH e A_w durante a maturação de embutidos apresentam padrões variados de dano e morte celular. Com isso, há dificuldade na recuperação de suas células injuriadas, as quais podem causar uma falha na determinação do comportamento dos patógenos (RIORDAN *et al.*, 1998; HWANG *et al.* 2009). No presente estudo, para tentar minimizar essa falha, utilizou-se o

meio de cultura TAL, o qual possibilitou uma maior média de recuperação de células quando comparada ao ágar XLD ($p < 0,05$). Segundo Nigthingale *et al.* (2006) essa diferença sugere a presença de células injuriadas, porém viáveis, e destaca a importância na utilização de meios sólidos de reparo capazes de avaliar com precisão a capacidade dos processos de fabricação de produtos RTE para controlar *S. enterica*.

Modelos dinâmicos que abordam a variação de patógenos durante o processamento de embutidos estão descritos (POND *et al.*, 2001, ERKMEN, 2008). O modelo matemático escolhido para este trabalho foi capaz de descrever a interface de crescimento e a inativação de *S. enterica*, considerando a interação entre os parâmetros intrínsecos durante a maturação. O valor de $\mu_{opt}(h^{-1})$ possibilitou que o modelo predissesse o crescimento de *S. enterica* observado em ambos estudos, Base e Validação, possibilitando a observação do ombro do modelo. Os parâmetros ajustados demonstraram que o modelo foi coerente, uma vez que $\delta_2^*(h) > \delta_1^*(h)$, ou seja, a resistência, em condições ótimas de sobrevivência, da subpopulação mais resistente é maior que a resistência da mais susceptível, possibilitando a observação da cauda do modelo.

A quantificação bacteriana no estudo Base e Validação demonstrou que a população aumentou até as primeiras 21 e 26 horas de maturação, respectivamente, resultando em um ombro seguido por uma cauda a qual pode estar relacionada com a resistência de subpopulações microbianas presentes (SAVRAN; PÉREZ-RODRÍGUEZ; KADIR HALKMAN, 2018). Segundo Coroller *et al.* (2015), durante a maturação, duas subpopulações de *S. enterica* podem apresentar comportamentos diferentes de resistência. Em nosso estudo, o parâmetro α , razão de logaritmos entre as subpopulações, teve valor próximo a zero, indicando que ambas as subpopulações sugeridas pelo modelo estavam em igual proporção (i.e $\log(1)=0$). Além disso, a presença de todos os isolados ao final da maturação na análise de PFGE indicou a homogeneidade das populações inoculadas inicialmente à massa do embutido e seus comportamentos semelhantes frente à maturação.

Embora a temperatura utilizada para a maturação no estudo Base não tenha sido determinante para a inativação bacteriana, porque não ultrapassou o valor cardinal, constatou-se que o aumento de temperatura influencia na inativação de microorganismos. Uma das razões, pela qual as temperaturas de 30°C e 25°C foram escolhidas para os cenários, foi a investigação do efeito do aumento de temperatura decorrente da falta de controle do processo. Nesse caso, foi demonstrado que a utilização de temperatura superior durante a maturação, no estudo Base, favoreceu a inativação de *S. enterica*, a

qual apresentou uma queda mais acelerada quando comparado ao estudo Validação. Os resultados do estudo concordaram com o estudo de Hwang *et al.* (2009), no qual *S. Typhimurium* apresentou maiores taxas de redução quando os embutidos foram armazenados em temperaturas de 21 e 30°C do que a 4°C. Outros micro-organismos parecem ter o mesmo comportamento quando submetidos à maturação. Novelli *et al.* (2017) observaram que o frio durante a dessecação de salame teve efeito protetor em relação à *Listeria monocytogenes*; enquanto que Faith *et al.* (1997) demonstraram uma maior redução de *E. coli* O157:H7 armazenadas a 21°C do que as armazenadas a 4°C.

A maturação realizada em temperatura mais elevada no estudo Base acelerou a redução de todas as variáveis físico químicas avaliadas (i.e. pH, Aw e peso). Apesar da fermentação no estudo Base ter ocorrido em 66 horas, ainda sim o pH caiu mais rapidamente até alcançar o seu valor mínimo de 5,17, quando comparado ao estudo Validação. De acordo com a modelagem matemática, o pH não foi determinante para a eliminação de *S. enterica*, pois a faixa de pH atingido no estudo Base não alcançou os valores cardinais limites necessários para inibição da bactéria.

A maioria dos micro-organismos apresenta crescimento máximo entre 0,990 e 0,995 de Aw. Por isso, a redução de Aw tem um efeito no crescimento bacteriano, aumentando a fase lag e diminuindo as taxas de crescimento da célula (BEALES, 2004). Os valores cardinais inseridos no modelo matemático, determinavam que a Aw 0,951 era o valor mínimo para ocorrer o crescimento da população de *S. enterica*. No estudo Base, ocorreu um decréscimo de 0,9565 a 0,7607, ultrapassando limite mínimo do valor cardinal e, por isso, diferentemente dos outros parâmetros estudados, a Aw foi o único parâmetro determinante para iniciar a inativação da população bacteriana.

A maturação de 39 dias do salame foi capaz de reduzir 4,95 log UFC.g⁻¹ de *S. enterica*, inativação alta quando comparada a outras reduções de 1,6 a 3 log UFC.g⁻¹ do mesmo micro-organismo em protocolos de fermentação e dessecação (SHAY, 1993; ELLAJOSYULA *et al.*, 1998; MATARAGAS *et al.* 2015). Um alcance de redução de 5 log UFC pode ser utilizado como indicador de uma produção segura (LINDQVIST; LINDBLAD, 2009). Embora o processamento tenha quase atingido esse valor, é importante destacar que o tempo de maturação nesse estudo foi ampliado para que a curva de comportamento de *S. enterica* pudesse ser conhecida e que essa duração extrapola os protocolos convencionais de elaboração de salame brasileiro, onde são comuns períodos de 14 a 28 dias (GOMIDE *et al.*, 1997; SANTA *et al.*, 2014; FIEIRA *et al.*, 2018). A concentração bacteriana inicial também foi aumentada com o mesmo objetivo, ou seja,

propiciar a avaliação do comportamento bacteriano. Embora sejam improváveis níveis de contaminação da matéria-prima próximos a $7 \log \text{ UFC.g}^{-1}$, a ocorrência de abuso de temperatura e contaminação cruzada durante o processamento pode aumentar a carga bacteriana inicial até níveis relativamente elevados (NIGHTINGALE *et al.* 2006).

Embora a modelagem matemática seja bastante utilizada, processos que não apresentam padronização podem levar a um tipo de incerteza chamado de incerteza metadoxástica. Essa incerteza atua no sentido prático de reduzir a confiança de que o algoritmo seja capaz de prever com acurácia um dado fenômeno (MURPHY *et al.*, 2011). No caso da produção de salames, além da formulação e duração da maturação não estarem determinadas em legislação (BRASIL 2000), a matriz cárnea pode apresentar microbiota competitiva, A_w e pH iniciais diferentes entre salames embutidos em uma mesma batelada e entre bateladas diferentes (ROCCATO *et al.* 2017). Por isso, a validação do modelo matemático torna-se necessária e foi realizada para garantir maior robustez ao modelo de predição.

No estudo Validação, um cenário de temperatura e tempo de maturação obrigatoriamente diferente do estudo Base foi utilizado para execução da validação do modelo. Esse estudo avaliou quão bem o modelo ajustado com os parâmetros de μ_{opt} , δ_1^* , δ_2^* e α , obtidos no estudo Base, previu o comportamento de *S. enterica* em outro cenário. Nesse caso, 95% dos valores observados puderam ser explicados pelos preditos e apesar da soma dos erros quadráticos aumentar de 1,47 no estudo Base para 3,86 no estudo Validação, o modelo ajustou-se bem à validação proposta, predizendo o comportamento de *S. enterica* em salame.

A partir dos resultados do modelo matemático, a simulação de um cenário típico de concentração e duração de maturação foi construído. A avaliação do modelo estocástico realizado para lidar com a incerteza da concentração inicial mostrou comportamento similar aos estudos realizados, com um aumento na concentração até as 25 horas seguido de uma queda e estabilização após 837 horas. Esse aumento na concentração do micro-organismo no primeiro dia de maturação deve ser considerado, pois em mercados informais o salame é comercializado sem maturação em virtude da preferência do consumidor, expondo-o, no entanto, ao maior risco de *S. enterica*. A incerteza na concentração inicial de *S. enterica* levou a um intervalo de confiança assimétrico, no qual o intervalo superior apresentou maior amplitude que o intervalo inferior. Do ponto de vista prático, de acordo com nossos resultados, a exposição à *S. enterica* pelo consumo de salames sem maturação pode alcançar $4 \log \text{ UCF.g}^{-1}$ (vide

Figura 23) sendo função da incerteza na concentração inicial. Considerando que a dose infectiva de *S. enterica* é variável, mas normalmente baixa (de 10 a 1000 células) (TEUNIS *et al.* 2010), mesmo se o salame estivesse contaminado com a dose mínima inicial calculada, este poderia ser um veículo para a infecção. Em relação ao limite máximo do intervalo de confiança, a concentração bacteriana alcançaria zero log UCF.g⁻¹ próximo a 600 horas (25 dias) de maturação. Embora ainda houvesse células bacterianas presentes, segundo análise de risco realizada por Corbellini *et al.* (2017) 24 dias de maturação garantiria um processo seguro para o consumo de salame.

A microbiologia preditiva aplicada a embutidos ainda é incipiente no Brasil. Pesquisas com salame estão mais relacionadas à utilização de bacteriocinas, culturas *starters* eficientes, melhoramento de características sensoriais ou substituição de agentes de curas (BARBOSA *et al.* 2015; DE CARVALHO *et al.*, 2017; KAWSKI *et al.*, 2017; FIEIRA *et al.*, 2018). São poucos os estudos relacionados ao comportamento dos patógenos frente às etapas da maturação. Corbellini *et al.* (2017) estimaram o risco de toxinfecção alimentar por *S. enterica* pelo consumo de salame no Brasil. A abordagem preditiva adotada utilizou o valor D (pH, T e Aw) por meio do modelo de Bigelow. Em nosso estudo, o modelo proposto considerou, além dos parâmetros ambientais, a interação entre eles e, também, parâmetros adicionais como os valores cardinais e a razão de subpopulações bacterianas existentes. Desta forma, esse modelo mostrou-se uma opção robusta para a predição da concentração de *S. enterica* e pode ser utilizado para a estimativa de riscos em trabalhos futuros. Além disso, o modelo aplicado a partir da elaboração de salame em laboratório, com a utilização de isolados relacionados à casuística brasileira e validação em diferente cenário pode ser uma importante ferramenta para a indústria, uma vez que esta disponha dos valores das suas variáveis ambientais.

9. CONCLUSÃO

A partir da geração das curvas de Aw e pH, o modelo matemático aplicado foi capaz de determinar os parâmetros de μ_{opt} , δ_1^* , δ_2^* e α e prever o comportamento de *S. enterica* no salame.

A validação realizada demonstrou que o modelo matemático descreve o comportamento de *S. enterica* em diferentes cenários de maturação.

A dessecação é etapa preponderante na inativação de *S. enterica* no processo de maturação do salame.

O modelo pode ser utilizado como ferramenta para a indústria de salame brasileiro.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, 3rd Edition, Cambridge, 463 p. 2008.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 212–219, 2008.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* Comparison of acids on the induction of an Acid Tolerance Response in *Salmonella Typhimurium*, consequences for food safety. **Meat Science**, v. 81, p. 65–70, 2009.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* Arginine and lysine decarboxylases and the acid tolerance response of *Salmonella Typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 278–282, 2010.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. *et al.* The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. **Food Research International**, v. 45, p. 482–492, 2012.

ANDINO, A.; HANNING, I. *Salmonella enterica*: survival, colonization and virulence differences among serovars. **The Scientific World Journal**, p. 1-16, 2015

ARGUELLO, H. *et al.* Sero- and genotyping of *Salmonella* in slaughter pigs, from farm to cutting plant, with a focus on the slaughter process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p 44–52, 2013.

ARGUELLO, H. *et al.* Prevalence and serovars of *Salmonella enterica* on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. **Food Research International**, v. 45, p. 905–912, 2013.

ARNEDO-PENA, A. *et al.* An outbreak of monophasic and biphasic *Salmonella Typhimurium*, and *Salmonella Derby* associated with the consumption of dried pork sausage in Castellon (Spain). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 34, p. 544–550, 2016.

AUDIA, J. P., WEBB, C. C., FOSTER, J. W. Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 291, p. 97–106, 2001.

AVIV, G. *et al.* A unique megaplasmid contributes to stress tolerance and pathogenicity of an emergent *Salmonella enterica* serovar Infantis strain. **Environmental Microbiology**, v. 16. p. 977–994, 2014.

BACTOFERM meat starter cultures table. Houston: Allied Kenco Sales, [20--?]. Disponível em: <
<http://www.alliedkenco.com/pdf/Culture%20Type%20And%20Uses.pdf>>. Acesso em: 29 de jun. 2017.

- BACTOFERM meat manual: fermented sausages with Chr. Hansen starter cultures. Hørsholm: Chr Hansen, 2009. v. 1. Disponível em: < <http://netropolitan.co.nz/wp-content/uploads/2014/10/Chr-Hansen-Meat-Brochure-141009.pdf> > . Acesso em: 29 de jun. 2017.
- BAKA, A. M. *et al.* Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, p. 54–61, 2011.
- BANG, I. S. *et al.* OmpR regulates the stationary phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2245–2252, 2000.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994.
- BARBOSA, M. S. *et al.* Bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* MBSa2 entrapped in calcium alginate during ripening of salami for control of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 47, p. 147-153, 2015.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low ph, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 1-20, 2004.
- BENEY, L.; GERVAIS, P. Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 34–42, 2001.
- BERENDS, B. R. *et al.* Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 199–206, 1997.
- BERK, P. A. *et al.* Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 859–866, 2005.
- BERTOL, M. T. *et al.* Rosemary extract and celery-based products used as natural quality enhancers for colonial type salami with different ripening times. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 4, p. 783-792, 2012.
- BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 80–84, 2004
- BOLDER, N. M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, p. 221–227, 1997.
- BONARDI, S. Salmonella in the pork production chain and its impact on human health in the European Union. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 2013, p. 1–14, 2017.

Disponível em:

<https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S095026881700036X/type/journal_article> Acesso em: 24 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.004 de 11 de dezembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: Atribuição de Função de Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 Carnes e Produtos Cárneos. **Diário [da] União**, Brasília, DF, 14 de dezembro de 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº22, de 31 de julho de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de de Copa, de Jerked Beef, de Presunto tipo Parma, de Presunto Cru, de Salame, de Salaminho, de Salaminho tipo Alemão, de Salame tipo Calabrês, de Salame tipo Friolano, de Salame tipo Napolitano, de Salame tipo hamburguês, de Salame tipo Italiano, de Salame tipo Milano, de Lingüiça Colonial e Pepperoni. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 3 de março de 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância e Saúde. Resolução. RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº55, de 7 de julho de 2003. Altera o subitem nº 4.2.2, dos anexos V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII e XIII, da Instrução Normativa nº 22, de 31 de julho de 2000, referente aos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Salames. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 8 de julho de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Informe 2018 Brasília, DF, fev. 2019 Disponível em : <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta---o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 27 mai. 2019

BUCKENHÜSKES, H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as cultures for various food commodities. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1-3, p. 253-272, 1993.

BUSSCHAERT, P. *et al.* Hierarchical Bayesian analysis of censored microbiological contamination data for use in risk assessment and mitigation. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 28, p. 712–719, 2011. Disponível em: <<http://www.cpmf2.be>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

BUZRUL, S.; ALPAS, H. Modeling inactivation kinetics of food borne pathogens at a constant temperature. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 632–637, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643806000399?via%3Dihub>>.

CACCIOPPOLI, J. *et al.* Aminas bioativas e características físico-químicas de salames tipo italiano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 648-657, 2006

CAMMACK, R. *et al.* Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, p. 475–488, 1999

CAMPAGNOL, P. C. B. *et al.* The influence of *achyrocline satureioides* (“Marcela”) extract on the lipid oxidation of salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 101-105, 2011.

CAMPOS, D.T. *et al.* Quantifying the robustness of a brothbased *Escherichia coli* O157: H7 growth model in ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2301–2309, 2005.

CASTAGNA, S. M. F. *et al.* Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 141-147, 2004.

CASTRO, L. C.; LUCHESE, R. H.; MARTINS, J. F. P. Efeito do uso da cepa starter de *Penicillium nalgiovense* na qualidade de salames. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2000.

CDC. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2016: Annual Report**. Atlanta, 2016. Disponível em: www.cdc.gov/fdoss/pdf/2016_FoodBorneOutbreaks_508.pdf. Acesso em: 19 mar.2019

CDC. **PulseNet Pathogens & Protocols: PFGE, protocols**. Atlanta, Dec. 2017. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html> >. Acesso em: 16 out. 2018

CEPEDA, J. F. *et al.* Heat and Mass Transfer Modeling for Microbial Food Safety Applications in the Meat Industry: A Review. **Food Engineering Reviews**, v. 5, n. 2, p. 57–76. 2013

CHASCO, J.; LIZASO, G.; BERIAIN, M. J. Cured colour development during sausage processing. **Meat Science**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 203–211, 1996.

CHEN, H. M. *et al.* Nontyphoidal *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy. **Pediatric Neonatology**, v. 54, p. 147–152, 2013.

CIROLINI, A. *et al.* Salame tipo italiano elaborado com culturas *starters* nativas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 171-179, 2010.

CICHOSKI, A. J.; ZIS, L. C.; FRANCESCHETTO, C. Características físico-químicas e microbiológicas da superfície do salame tipo italiano contendo solução de lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 546-552, 2009.

CIROLINI, A. *et al.* Salame tipo italiano elaborado com culturas *starters* nativas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 171-179, 2010.

CORBELLINI, L. G. *et al.* Quantitative microbial risk assessment of *Salmonella* in dry fermented sausage (salami) in Southern Brazil. **Microbial Risk Analysis**, [s. l.], v. 6, p. 31–43, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mran.2017.02.001>

COROLLER, L. *et al.* General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. **Appl. Environ. Microbiol.** 72, 6493–6502, 2006.

COROLLER, L. *et al.* Modelling of growth, growth/no-growth interface and nonthermal inactivation areas of *Listeria* in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 139-152, 2012

COROLLER, L. *et al.* Extending the gamma concept to non-thermal inactivation: A dynamic model to predict the fate of *Salmonella* during the dried sausages process. **Food Microbiology**, v. 45, p. 266-275, 2015.

COWDEN, J. M. *et al.* A national outbreak of *Salmonella* typhimurium DT124 caused by contaminated salami sticks. **Epidemiology and Infection**, v. 103, p. 219–225, 1989.

CULTURA para salame – influência de temperatura, UR, açúcar, sal, etc. Campinas: Sacco Brasil, 2013. Disponível em: <http://www.saccobrasil.com.br/Culturas_para_salame.pdf>. Acesso em: 29 de jun. 2017.

DALLA SANTA, O. R. *et al.* Use of starter cultures isolated from native microbiota of artisanal sausage in the production of Italian sausage. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 780-786, 2014.

DUARTE, A.S.R., 2013. The interpretation of quantitative microbial data meeting the demands of quantitative microbiological risk assessment. Technical University of Denmark.

DE CARVALHO, C. C. P. *et al.* Produção de embutido cárneo fermentado por *E. faecium* como cultura starter: Caracterização físico-química e microbiológica, aceitação sensorial e viabilidade celular. **Acta Scientiarum - Technology**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 395–402, 2017.

DENIS, M. *et al.* Distribution of serotypes and genotypes of *Salmonella enterica* species in French pig production. **Veterinary Record**, v. 173, p. 370, 2013.

DROSINOS, E. H. *et al.* Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. **Meat Science**, v. 69, n. 2, p. 307-317, 2005.

DUFFY, G.; WHITING, R. C.; SHERIDAN, J. J. The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. **Food Microbiology**, v. 16, p. 299-307, 1999.

DUFFY, L. L.; GRAU, F. H.; VANDERLINDE B. Acid resistance of enterohaemorrhagic and generic *Escherichia coli* associated with foodborne disease and meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 83–89, 2000.

EFSA. **Antimicrobial resistance on the rise in the European Union, EFSA and ECDC warn**. Parma, feb. 2016. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160211>>. Acesso em: 22 de junho de 2017.

ELLAJOSYULA, K. R. *et al.* Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in Lebanon bologna by interaction of fermentation, pH, heating temperature, and time. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 152–157, 1998.

EL-SHAARAWI, A. H.; ESTERBY, S. R.; DUTKA, B. J. Bacterial Density in Water Determined by Poisson or Negative Binomial Distributions. **Applied and Environmental Microbiology**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC243648/pdf/aem00194-0127.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

ERKMEN, O. Modeling the effects of sucuk production technique on *Listeria monocytogenes*, aerobic bacteria and lactic acid bacteria during ripening and storage. **Food and Bioproducts Processing**, v. 86, n. 3, p. 220-226, 2008.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Rules and Regulations 9 CFR, Part 301, 303. Performance standard for the production of processed meat and poultry products, **Federal Register**, Washington, DC, v. 66, n. 39, Feb., 2001. Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/97-013P.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2017.

FAITH, Nancy G. *et al.* Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21, 4 and –20 ° C under air, vacuum and CO₂. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 47–54, 1997. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160597000524?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 fev. 2019.

FIEIRA, C. *et al.* The impact of the partial replacement of sodium chloride in the development of starter cultures during Italian salami production. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 21, 2018.

FORSYTHE, S. J.; HAYES, P.R. **Food hygiene, microbiology and HACCP**, 3. ed, USA: An aspen publication. 1998. 480 p.

FORSYTHE S. J. Aspectos básicos. In:_____. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap. 2, p. 82-142.

FOSTER, J. W. The acid tolerance response of *Salmonella* typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 1981-1987, 1993.

GAL-MOR, O. *et al.* Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis, Israel. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 1754–1757, 2010.

GARCIA, F. T.; GAGLEAZZI, U. A.; SOBRAL, P. J. A. Variação das propriedades físicas e químicas do salame tipo italiano durante secagem e fermentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 151-158, 2000.

- GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T.A. Predicting microbial growth: growth responses of *salmonellae* in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 155-178, 1988.
- GIBSON, A. M.; ROBERTS, T. A. The effect of pH, water activity, sodium nitrite and storage temperature on the growth of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonellae* in a laboratory medium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, p. 183–194, 1986.
- GOMIDE, L. A. *et al.* Avaliação físico-química e microbiológica da adição de carne de frango mecanicamente separada em embutido fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 125-131, 1997.
- GONZALES-BARRON, U.A.; REDMOND, G.; BUTLER, F. A risk characterization model of *Salmonella* Typhimurium in Irish fresh pork sausages. **Food Research International**, v. 45, p. 1184–1193, 2012.
- GONZÁLEZ, M.; SKANDAMIS, P. N.; HÄNNINEN, M.-L. A modified Weibull model for describing the survival of *Campylobacter jejuni* in minced chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 52–58, 2009.
Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509005054?via%3Dihub>>.
Acesso em: 31 out. 2018.
- GØTTERUP, J. *et al.* Colour formation in fermented sausages by meat associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. **Meat Science**, v. 78, p. 492-501, 2008.
- GOUNADAKI, A. S. *et al.* Effect of packing and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on slice salami. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 10, p. 2313-2320, 2007.
- GREENACRE, E. J. *et al.* *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20 °C: Optimization and modeling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3945–3951, 2003.
- GUAN, N. *et al.* Microbial response to environmental stresses: from fundamental mechanisms to practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 10, p. 3991-4008, 2017
- GUIBOURDENCHE, M. *et al.* Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White Kauffmann-LeMinor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26- 29, 2010
- HAMMES, W. P. Metabolism of nitrate in fermented meats: the characteristic feature of a specific group of fermented foods. **Food Microbiology**, v. 29, p. 151-156, 2012.
- HENDRIKSEN, R. S. *et al.* Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 887–900, 2011

HUFFMAN, R. D. Current and future technologies for the decontamination of carcasses and fresh meat. **Meat Science**, v. 62, p. 285–294, 2002

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, p. 139–150, 1998.

HURD, H. S. *et al.* The Effect of Lairage on *Salmonella* Isolation from Market Swine, **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 939–944, 2001.

HWANG, C. *et al.* Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium during fermentation, drying, and storage of soudjouk-style fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 244–252, 2009.

INNPPAZ OPS/OMS. **Sistema de informacion para la vigilancia de las enfermedades transmitidas por los alimentos**. Duque de Caxias, 2002. Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/report_eta01.asp> Acesso em: 05 mai. 2017

ISO 6579. **Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** 4 ed. 2002. The international Organization for Standardization, amendment 1., Jul. 2007.

IZUMI, K.; CASSENS, R. G.; GREASER, M. L. Reaction of nitrite with ascorbic acid and its significant role in nitrite cured foods. **Meat Science**, v. 26, p. 141-145, 1989.

JARMAN, K. H. *et al.* Bayesian-Integrated Microbial Forensics. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 74, n. 11, p. 3573–3582, 2008. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bayesian_network>. Acesso em: 18 jan. 2019.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6. ed. New York: Aspen Publishers, 2000. 635 p. (Aspen Food Science Text Series).

JONES, T. F. *et al.* Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 198, p. 109–114, 2008

JULIAN, E. *et al.* *Salmonella* Montevideo infections associated with salami products made with contaminated imported black and red pepper -United States, July 2009-April 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 59, n. 50, p. 1647-1650, 2010.

JUNEJA V. K. *et al.* Interactive effects of temperature, pH, and water activity on the growth kinetics of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O104:H4. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 5, p. 706–712, 2014.

KANG, D. H.; FUNG, D. Y. Application of thin agar layer method for recovery of injured *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 127-132, 2000.

KAWSKI, V. L. *et al.* Sensory and physicochemical characteristics of salamis added with vegetable-based curing ingredients. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 47, n. 8, 2017.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000800781&lng=en&tlng=en>

KICH, J. D. *et al.* Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 307–313, 2011

KRANKER, S. *et al.* Longitudinal study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infection in three Danish farrow-to-finish swine herds. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2282–2288, 2003

KUDA, T. *et al.* Effect of dried and vinegar flavored squid products on acid resistance of *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 30, p. 569–574, 2013.

LABUZA, T. The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration. **Food Technology**, v. 34, n. 4, p. 36–41, 1980.

LE MARC, Y. *et al.* Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 73, n. 2–3, p. 219–237, 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160501006407>>

LEYER G. J.; JOHNSON E. A. Acid adaption induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella* typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1842–1847, 1993.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Evaluation of the strain variability of *Salmonella enterica* acid and heat resistance. **Food Microbiology**, v. 34, p. 259–267, 2013.

LINDQVIST, R.; LINDBLAD, M. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 129, n. 1, p. 59–67, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.011>>

LYOCARNI – Culturas para aplicações em carne. Campinas: Sacco Brasil, 2013. Disponível em: <http://saccobrasil.com.br/produtos/culturas.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2017.

LÜCKE, F. K. Fermented meat products. **Food Research International**, v. 27, n. 3, p. 299–307, 1994.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, n. 2, p. 105–115, 2000.

LUZZI, I. *et al.* **Outbreak report**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.eurosurveillance.org/docserver/fulltext/eurosurveillance/12/4/art00702-en.pdf?expires=1543752274&id=id&accname=guest&checksum=98C87394229BD12FB79710EDCCE9FB3A>>. Acesso em: 2 dez. 2018.

- MACEDO, R. E. F. *et al.* Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 509-519, 2008.
- MARCHESI, C. M. *et al.* Influência das Condições de Armazenamento sobre os Pigmentos Cárneos e a Cor do Salame Italiano Fatiado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 697-704, 2006.
- MARANGONI, C.; MOURA, N. F. Antioxidant activity of essential oil from *Coriandrum Sativum* L. in Italian salami. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 124-128, 2011.
- MATARAGAS, M. *et al.* Risk-based control of food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the Italian fermented sausages Cacciatore and Felino. **Meat Science**, [s. l.], v. 103, p. 39–45, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.01.002>>
- MAURIELLO, G. *et al.* Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 149-158, 2004.
- MCDONALD, K.; SUN, D. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 52, p. 1–27, 1999
- MCMEEKIN, T.A. *et al.* Quantitative microbiology: a basis for food safety. **Emerging Infection Disease**, v. 3, p. 541–549, 1997
- MIRALLES, M. C.; FLORES, J.; PEREZ-MARTINEZ, G. Biochemical tests for the selection of Staphylococcus strains as potential meat starter cultures. **Food Microbiology**, v. 13, p. 227–236, 1996.
- MÜLLER, K. *et al.* Survival and growth of epidemically successful and nonsuccessful *Salmonella enterica* clones after freezing and dehydration. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 456–464, 2012
- MÜRMAN, L.; SANTOS, M.C.M.; CARDOSO, M. R. I. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 191-195, 2009.
- MURPHY, C.; GARDONI, P.; JR, C. E. H. Classification and Moral Evaluation of Uncertainties in Engineering Modeling. [s. l.], p. 553–570, 2011.
- NAUTA, J. M.; DUFRENNE, J. B. Variability in growth characteristics of different *e. coli* O157:H7 isolates, and its implications for predictive microbiology. **Quantitative Microbiology**, v. 1, p. 137-155, 1999.
- NIGHTINGALE, K. K. *et al.* Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 794–800, 2006

- NISSEN, H., HOLCK, A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* Kentucky in Norwegian fermented, dry sausage. **Food Microbiology**, v. 15, p. 273–279, 1998.
- NOVELLI, Enrico *et al.* Analysis of process factors of dry fermented salami to control *Listeria monocytogenes*. **Italian Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 28–32, 2017. Disponível em: <<http://www.combase.cc/index.php/en/>>. Acesso em: 31 out. 2018.
- ORDOÑEZ, J. A. *et al.* **Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 2 v, 279 p.
- PARDI M. C. *et al.* **Ciência, higiene e tecnologia da carne**. Goiânia: Ufg, 2001. 2 v. 1147 p.
- PELTIER, M. Jornal do Comercio. **Fãs da Linguiça e Ranking Doméstico**. São Paulo. 2010. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/news/206/134/Fas-da-Linguica-e-Ranking-Domestico.html>> Acesso em: 24 jul. 2015
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A. **Predictive microbiology in foods**. Córdoba: Springer, 2013. 132 p.
- PISSETTI C. *et al.* Detecção de *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* em carcaças na etapa de pré-resfriamento. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, p. 1-8, 2012.
- POND, T.J., WOOD, D.S., MUMIN, I.M., BARBUT, S., GRIFFITHS, M.W. Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in uncooked, semidry, fermented sausage. **Journal of Food Protection** 64, 759–766. 2001
- PONTELLO, M. A community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy. **Epidemiology and Infection**, v. 120(3), p. 209–214, 1998
- PORTO-FETT, A.C.S. *et al.* Viability of multi-strain mixtures of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, or *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into the batter or onto the surface of a soudjouk-style fermented semi-dry sausage. **Food Microbiology**, v. 25, p. 793-801, 2008.
- PRAGALAKI, T., BLOUKAS, J.G., KOTZEKIDOU, P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in liquid broth medium and during processing of fermented sausage using autochthonous starter cultures. **Meat Science**, v. 95, p. 458-464, 2013.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2ª ed. Iowa: Wileyblackwell, 1231 p., 2011

RAJKOWSKI, K. T. *et al.* Efficacy of Washing and Sanitizing Trailers Used for Swine Transport in Reduction of *Salmonella* and *Escherichia coli* **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 1, p. 31-35, 1998.

RATKOWSKY D. A. *et al.* Relationship between temperature and growth rates of bacterial cultures. **Journal of Bacteriology**, v. 149, p. 1-5, 1982.

RISTORI, C. A. *et al.* Assessment of consumer exposure to *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products at retail in the city of Sao Paulo, Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 0, n. 0, p. 1-7, 2017.

RIORDAN, D.C.R. *et al.* Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during manufacture of pepperoni. **Journal of Food Protection**. 61, 146–151. 1998

ROCCATO, A. *et al.* Artisanal Italian salami and sopresse: Identification of control strategies to manage microbiological hazards. **Food Microbiology**, v. 61, p. 5-13, 2017.

ROCCO, S. C. **Embutidos, frios e defumados**. EMBRAPA – SPI, 1. ed. Brasília. 1996. 94 p.

RODRÍGUEZ, E. C. *et al.* Vigilancia por laboratorio de *Salmonella enterica* en casos clínicoshumanos en Colombia 2005 a 2011. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 2016.

ROSSO, L.; ROBINSON, T. P. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 265–273, 2001.

ROSSO, L. *et al.* Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 610–616, 1995.

RUBIO, B. *et al.* Model for *Listeria monocytogenes* inactivation by high hydrostatic pressure processing in Spanish chorizo sausage. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 69, p. 18–24, 2018.

RUST, R. E. Productos embutidos. In: PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. (Org.). **Ciencia de la carne y de productos carnicos**. 2nd ed. Zaragoza: Acribia, 1994. p. 415-440.

SANTA, O. R. D. *et al.* Use of starter cultures isolated from native microbiota of artisanal sausage in the production of Italian sausage. **Food Science and Technology (Campinas)**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 780–786, 2014. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84923935901&partnerID=tZOtx3y1>>

SANTOS, L. F. L. *et al.* Evaluation of biogenic amines levels, and biochemical and microbiological characterization of Italian-type salami sold in Rio de Janeiro, Brazil. **Italian Journal of Food Safety**, v. 4, p. 137-141, 2015.

SAVRAN, D.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; KADIR HALKMAN, A. Modelling survival of *Salmonella* Enteritidis during storage of yoghurt at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 271, n. February, p. 67–76, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.017>

SCALTRITI, E. *et al.* Differential single nucleotide polymorphism-based analysis of an outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Manhattan reveals epidemiological details missed by standard pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of clinical microbiology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 1227–38, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25653407>>. Acesso em: 30 nov. 2018.

SCIENTIFIC report of EFSA and ECDC: the European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013, **The EFSA Journal**. Parma, v. 13, n. 1, p. 1-162, jan. 2015. Disponível em: <<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2013.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2017

SCIENTIFIC report of EFSA and ECDC: the European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016, **The EFSA Journal**. Parma, v. 15 n. 12, p. 1-228, nov. 2017. Disponível em: <<http://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2017.5077>>. Acesso em: 19 mar. 2019

SCHROEDER, S. *et al.* A prolonged outbreak of *Salmonella* Infantis associated with pork products in central Germany, April–October 2013. **Epidemiology and Infection**, v. 144, p. 1429-1439, 2016.

SCHWARZ, P. *et al.* *Salmonella enterica*: isolamento e soroprevalência em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1028-1034, 2009.

SHAY, B. J. Factors affecting growth and survival of *Salmonella* in fermented salami manufactured under Australian conditions. **Australian Veterinarians in Public Health and Australian Veterinarians in Industry. Proceedings of the Gold Coast Scientific Program**. pp. 23–32. 1993.

SILVA, L. E. *et al.* Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 455-461, 2006.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**: 4.ed. São Paulo. Varela. 2010. 624 p.

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

SILVA L. E. *et al.* Longitudinal dissemination of *Salmonella enterica* clonal groups through the slaughter process of *Salmonella*-positive pig batches. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1580-1588, 2012.

SKIBSTED, L. H. Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. **Nitric Oxide**, v. 24, p. 176–183, 2011.

SMID, J. *et al.* Variability and uncertainty analysis of the cross-contamination ratios of salmonella during pork cutting. **Risk analysis: an official publication of the Society for Risk Analysis**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 1100–1115, 2013.

SMITH, J. L. *et al.* Survival of *salmonellae* during pepperoni manufacture. **Applied Microbiology**, v. 30, p. 759–763, 1975.

SPERBER W. H. Influence of water activity on foodborne bacteria - A review. **Journal of Food Protection**, v. 46, p. 142-150, 1983.

STAHNKE, L. H.; TJENER, K. Influence of Processing Parameters on Cultures Performance. In: TOLDRÁ, F. (Ed.). **Handbook of fermented meat and poultry**. Hoboken: Blackwell, 2008. cap. 18, p. 187-194.

STEVENS, M.P.; HUMPHREY, T.J.; MASKELL, D.J. Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 364(1530), p. 2709-23, 2009.

TEUNIS, Peter F. M. *et al.* Dose–response modeling of Salmonella using outbreak data. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 144, n. 2, p. 243–249, 2010. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160510005519>>. Acesso em: 11 mar. 2019.

TIGANITAS, A. *et al.* Study of the effect of lethal and sublethal pH and aw stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p.104-112, 2009.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from meat, poultry, egg and enviomental samples. In: United States Department of Agriculture (USDA)/ Food Safety and Inspection Service (FSIS), Microbiology Laboratory Guidebook. 2009.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 139– 159, 2002.

VIGNOLO, G. M.; HOLGADO, A. P. R; OLIVER, G. Use of bacterial cultures in the ripening of fermented sausages. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 787-791, 1989.

VISSCHER, C. F. *et al.* Serodiversity and serological as well as cultural distribution of *Salmonella* on farms and in abattoirs in Lower Saxony, Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 44–51, 2011

WANG, H. *et al.* *Salmonella* biofilm and relationship to cell characteristics. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 10, 2013.

WHITING, R. C. Microbial modeling in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 467-494. 1995

ZOCHE, F. *et al.* Microrganismos indicadores e *Salmonella* sp. em salames produzidos e comercializados na região oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 05, n. 01, p. 336-345, 2011

ZWIETERING, M. H. *et al.* A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, p. 324–329, 1992.

APÊNDICE A- Quadro demonstrativo da definição e composição entre os salames descritos na IN 22/2000 e IN 55/2003

Tipo de Salame	Granulometria da moagem	Obrigatoriedades diferenciais	Ingredientes		Características Físico-Químicas
			Obrigatórios	Opcionais	
<i>Salame tipo Italiano</i>	Entre 6 e 9 mm	Elaborado com pelo menos 60% de carne suína ou suína e bovina.	Carne Suína Toucinho Sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio	Carne bovina Leite em pó Açúcares/ Maltodextrinas Proteínas lácteas Aditivos intencionais / Vinho Condimentos, aromas e especiarias Substâncias glazeantes (revestimento externo)	Atividade de água (máx.) 0,90 Umidade (máx) 35% Gordura (máx.) 35% Proteína (mín.) 25% Carboidratos totais (máx.) 4,0%
<i>Salame tipo Alemão</i>	Entre 3 e 6 mm	Elaborado exclusivamente com carne suína.	Carne suína Toucinho Sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio	Leite em pó Açúcares / Maltodextrinas Proteínas lácteas Aditivos intencionais /Vinho Condimentos, aromas e especiarias Substâncias glazeantes (revestimento externo)	Atividade de água (máx.) 0,90 Umidade (máx) 35% Gordura (máx.) 32% Proteína (mín.) 25% Carboidratos totais (máx.) 4,0%
<i>Salame tipo Calabrês</i>	Entre 10 e 15 mm	Elaborado com pelo menos 60% de carne suína ou suína e bovina. Produto caracterizado pelo sabor picante e calibre de 80 mm. Deve conter pimenta calabresa em sua composição.	Carne Suína Toucinho Pimenta calabresa Sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio	Leite em pó Açúcares/ Maltodextrinas Proteínas lácteas Aditivos intencionais/Vinho Condimentos, aromas e especiarias Substâncias glazeantes (revestimento externo)	Atividade de água (máx.) 0,90 Umidade (máx) 35% Gordura (máx.) 35% Proteína (mín.) 25% Carboidratos totais (máx.) 4,0%
<i>Salame tipo Friolano</i>	Entre 6 e 9 mm	Elaborado exclusivamente com carne suína.	Carne Suína Toucinho Sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio	Leite em pó Açúcares /Maltodextrinas Proteínas lácteas Aditivos intencionais/Vinho Condimentos, aromas e especiarias Substâncias glazeantes (revestimento externo)	Atividade de água (máx.) 0,90 Umidade (máx) 35% Gordura (máx.) 30% Proteína (mín.) 25% Carboidratos totais (máx.) 4,0%

<i>Salame tipo Napolitano</i>	Entre 8 a 12 mm	Elaborado com pelo menos 60% de carne suína ou suína e bovina. Deve conter pimenta do reino quebrada ou em grãos e alho.	Carne Suína Toucinho Pimenta do reino Alho, Sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio	Carne bovina Leite em pó Açúcares / Maltodextrinas Proteínas lácteas Aditivos intencionais/ Vinho Condimentos, aromas e especiarias Substâncias glazeantes (revestimento externo)	Atividade de água (máx.) 0,91 Umidade (max) 35% Gordura (máx.) 35% Proteína (mín.) 23% Carboidratos totais (máx.) 4,0%
<i>Salame tipo Hamburguês</i>	Entre 3 e 6 mm	Elaborado com pelo menos 50% de carne suína ou suína e bovina.	Carne Suína (mín. 50%) Toucinho Sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio	Carne Bovina Leite em pó Açúcares /Maltodextrinas Proteínas lácteas Aditivos intencionais /Vinho Condimentos, aromas e especiarias Substâncias glazeantes (revestimento externo)	Atividade de água (máx.) 0,92 Umidade (max) 40% Gordura (máx.) 35% Proteína (mín.) 23% Carboidratos totais (máx.) 4,0%
<i>Salaminho</i>	Entre 6 e 9 mm	Elaborado com pelo menos 60% de carne suína ou suína e bovina. Produto caracterizado por ser embutido em tripas com calibre de até 50 mm.	Carne suína (mín. 60%) Toucinho Sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio	Carne Bovina Leite em pó Açúcares / Maltodextrinas Proteínas lácteas Aditivos intencionais / Vinho Condimentos, aromas e especiarias Substâncias glazeantes (revestimento externo)	Atividade de água (máx.) 0,90 Umidade (max) 35% Gordura (máx.) 32% Proteína (mín.) 25% Carboidratos totais (máx.) 4,0%
<i>Salame tipo Milano</i>	Entre 3 e 6 mm	Elaborado com pelo menos 60% de carne suína ou suína e bovina.	Carne Suína (mín. 60%) Toucinho Sal, nitrito e/ou nitrato de sódio e/ou potássio	Carne bovina Leite em pó Açúcares /Maltodextrinas Proteínas lácteas Aditivos intencionais / Vinho Condimentos, aromas e especiarias Substâncias glazeantes (revestimento externo)	Atividade de água (máx.) 0,90 Umidade (max) 35% Gordura (máx.) 35% Proteína (mín.) 23% Carboidratos totais (máx.) 4,0%

APÊNDICE B- Relação de cepas de *Salmonella enterica* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva-UFRGS com sorovares correspondentes a sua origem submetidos aos testes de desempenho em pH 5 (BHI + ácido láctico).

Bacterioteca	Sorovar	Origem
3	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
761	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
764	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
775	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
781	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
787	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
791	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
1065	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
1066	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
1075	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
1077	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
1089	<i>Salmonella</i> Derby	Linguiça frescal
762	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
771	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
776	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
778	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
1001	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
1012	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
1039	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
1043	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
1048	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
1054	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
1057	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
1061	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Linguiça frescal
1	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Salame
3	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Salame
7	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Salame
10	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Salame
7	<i>Salmonella</i> Infantis	Linguiça frescal
751	<i>Salmonella</i> Infantis	Linguiça frescal
752	<i>Salmonella</i> Infantis	Linguiça frescal
758	<i>Salmonella</i> Infantis	Linguiça frescal

APÊNDICE C: Média dos registros da umidade relativa do ar e temperatura na câmara de maturação aferidos duas vezes ao dia durante a execução dos estudos Piloto, Base e Validação.

