

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

USO DE ULTRASSOM E DIÓXIDO DE CLORO (ClO₂) NA REDUÇÃO DA CARGA MICROBIANA DE *Salmonella* Typhimurium NA ÁGUA DE RESFRIAMENTO DE CARCARÇAS DE FRANGO

A. P. Rossi¹, D. L. Kalschne¹, A. P. I. Byler¹, J. S. Barin², E. L. M. Flores³, C. Canan¹

1- Departamento de Alimentos – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 85884-000 – Medianeira – PR – Brasil, Telefone: 55 (45) 3240-8109, e-mail: (anap.rossi@hotmail.com); (daneysa@hotmail.com); (anapaulabyler@outlook.com); (eder.utfpr@gmail.com) (canan@utfpr.edu.br)

2- Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria – CEP: 97105-900 – Santa Maria – RS – Brasil, Telefone: 55 (55) 3220-8254, e-mail: (juliano@ufsm.br)

3 – Departamento de Química – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – CEP: 85884-000 – Medianeira – PR – Brasil, Telefone: 55 (45) 3240-8109, e-mail: (eder@utfpr.edu.br)

RESUMO – Para assegurar a inocuidade da carne, um alimento altamente perecível, os abatedouros utilizam diferentes técnicas, como métodos físicos ou químicos para a inibição microbiana. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação do ultrassom isoladamente e/ou em combinação com ClO₂ na redução da contagem de *Salmonella* Typhimurium na água de *chillers* de resfriamento de carcaças elaborada por simulação. Realizando um PFC 2³ seguido de um segundo delineamento PFC 2², com as variáveis independentes tempo de sonicação de (1 a 9 min) e concentração de ClO₂ (1 ppm a 17 ppm) onde tempo de sonicação de 1 min e concentração de ClO₂ de 17 ppm tiveram efeitos significativos na redução da contagem. Na sequência realizou-se a validação do método, obtendo como resultado a inibição total da *Salmonella* Typhimurium na temperatura de 4 °C com tempo do uso do ultrassom durante 1 min e a adição de 30 ppm de ClO₂.

ABSTRACT – To ensure the safety of meat, a highly perishable food, slaughterhouses use different techniques, including physical or chemical methods for microbial inhibition. The aim of this study was to evaluate the application of ultrasound alone and/or in combination with ClO₂ to reduce the *Salmonella* Typhimurium count in the carcass cooling chillers water elaborated by simulation. A PFC 2³ followed by a second design PFC 2², with the independent variables sonication time from (1 to 9 min) and ClO₂ concentration (1 to 17 ppm); the sonication time of 1 min and ClO₂ concentration of 17 ppm have significant effects in reducing the count. From these results, the method was validated, resulting in the total inhibition of *Salmonella* Typhimurium at a temperature of 4 °C with the time of using the ultrasound for 1 min and the addition of 30 ppm of ClO₂.

PALAVRAS-CHAVE: Amplitude de frequência; Agentes químicos; *Salmonella enterica*.

KEYWORDS: Frequency amplitude; Chemical agents; *Salmonella enterica*.

1. INTRODUÇÃO

Segundo o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2019) o Brasil é o segundo maior produtor e o primeiro maior exportador de carne de frango do mundo, refletindo em uma produção cercada de tecnologia e de avanços tecnológicos (Loretz et al., 2010).

Durante o processo de resfriamento das carcaças, conforme entram e se movem pelo tanque de *chiller*, as carcaças liberam grandes quantidades de material orgânico na forma de sangue, gordura e proteína (Munther et al., 2016) e esse material altera a composição química da água de resfriamento de carcaças de aves e afeta

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br

diretamente a contagem microbiana (Russel, 2012). A Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998 prevê que a água no sistema de pré-resfriamento (pré-*chiller*) não deve ser superior a 4°C e deve estar em constante renovação, podendo ser hipoclorada, permitindo-se o máximo de 5 ppm de cloro livre (Brasil, 1998).

O processo de descontaminação durante o resfriamento (*chillers*) é utilizado como um passo para a preservação dos alimentos e alguns dos antimicrobianos utilizados na água de resfriamento mais comumente usados nas indústrias são substâncias a base de cloro como o dióxido de cloro (Skovgaard, 2010).

O ultrassom é uma tecnologia inovadora com aplicações tanto na análise quanto na modificação de alimentos, definidas como ondas sonoras superiores aquelas que podem ser detectadas pelo ouvido humano (20 kHz) (Alarcon-Rojo et al., 2015). Esta tecnologia é capaz de melhorar os processos existentes como uma técnica especializada e versátil que possui aplicações nos alimentos, que por muitas vezes é usada para extrair, misturar, emulsionar ou esterilizar líquidos tão diversos como leite, iogurte e sucos de frutas (Paniwnyk, 2017).

Considerando o risco da contaminação cruzada na etapa de resfriamento das carcaças de frangos em *chillers*, o objetivo desse estudo foi avaliar a aplicabilidade do ultrassom isoladamente e/ou em combinação com o dióxido de cloro em amostras simuladas de água de *chillers* para a redução de contagem de *Salmonella* Typhimurium.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A água de “*chiller*” foi obtida por simulação em *tumbler* (Dorit, VV-T-10, Vacuum) utilizando 3 frangos depenados, eviscerados e refrigerados (7 a 9 °C), sem pés, sem cabeça, com peso de 2,5 kg abatidos no dia anterior ao procedimento em uma propriedade particular associada a um abatedouro de aves no Oeste do Paraná. Cada frango foi tumbleado separadamente por 1 hora em 4,5 L de água destilada e resfriada a 16 °C.

2.1 Planejamento Fatorial Completo 2³

Foi realizado um Planejamento Fatorial Completo (PFC) com três variáveis independentes (2³) e triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios que foram realizados aleatoriamente e mais 3 controles, sendo Controle 1 sem aplicação de ultrassom e adição de ClO₂, Controle 2 somente aplicação de ultrassom no nível superior e Controle 3 somente adição de ClO₂ no nível superior. Para a realização deste PFC utilizou-se água destilada estéril (121 °C por 15 min) (Silva et al., 2018). Na Tabela 1 são mostradas as três variáveis independentes estudadas, x_1 (amplitude de frequência, %), x_2 (tempo, min) e x_3 (concentração de cloro, ppm (VV⁻¹)) e a matriz do planejamento experimental (2³). A variável dependente ou função-resposta (y) foi expressa como log₁₀ UFC/g de *Salmonella* Typhimurium. As variáveis e os níveis de variação foram selecionados com base em dados da literatura e de acordo com as condições de operação do banho de ultrassom (Elmasonic P120H, frequência 37 kHz, potência 330 W, Singen, Alemanha).

Para análise de regressão, variância e superfície de resposta foi utilizado o programa *Statistica* 10.0.

Tabela 1 - Matriz do Planejamento Fatorial Completo (2³) com as variáveis independentes reais e codificadas.

Ensaio	Variáveis		
	x_1	x_2	x_3
1	-1 (40)	-1 (5)	-1 (1)
2	1 (100)	-1 (5)	-1 (1)
3	-1 (40)	1 (15)	-1 (1)
4	1 (100)	1 (15)	-1 (1)
5	-1 (40)	-1 (5)	1 (9)
6	1 (100)	-1 (5)	1 (9)
7	-1 (40)	1 (15)	1 (9)
8	1 (100)	1 (15)	1 (9)
9	0 (70)	0 (10)	0 (5)
10	0 (70)	0 (10)	0 (5)
11	0 (70)	0 (10)	0 (5)



C1	-	-	-
C2	1 (100)	1 (15)	-
C3	-	-	1 (9)

x_1 : Amplitude (%); x_2 : Tempo (min); x_3 : Dióxido de cloro (ppm); C1: sem aplicação de ultrassom e adição de ClO_2 ; C2: somente aplicação de ultrassom e C3: somente adição de ClO_2 . - Fonte: Autoria própria.

2.2 Planejamento Fatorial Completo 2² e Validação do Modelo

Com base nos resultados obtidos no PFC 2³ optou-se por realizar um PFC 2² com as variáveis tempo de sonicação e concentração de dióxido de cloro nos níveis de 1, 5 e 10 min de sonicação e 1, 9 e 17 ppm de dióxido de cloro, respectivamente e após estabelecida a melhor condição para a redução da *Salmonella Typhimurium* obtida no PFC 2² em água pura, foi feita a validação do modelo para ambos microrganismos utilizando água de “chiller”.

A validação foi necessária para verificação dos dados significativos e repetição das análises em triplicata para cada ensaio selecionado. Posteriormente, foi realizada a ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$) utilizando-se o programa *STATISTICA* 10.0 (Statsoft Inc. Tulsa, USA).

2.3 Aplicação do Ultrassom

Para realização dos ensaios, alíquotas de 100 mL de água estéril foram inoculadas com 1 mL da suspensão contendo microrganismo reativado e submetidas ao tratamento ultrassônico (Elmasonic P 120H, Singen, Alemanha) de acordo com os PFCs apresentados anteriormente. As variáveis de controle foram o volume e substituição da água no tanque, temperatura de exposição, a quantidade e a disposição dos erlenmeyers a partir do fundo do tanque e o tempo de sonicação.

Durante a aplicação do ultrassom, a temperatura da água foi mantida em 30 °C com adição de gelo/água gelada, quando necessário.

2.4 Determinação de cloro livre em água

Para verificar o teor de cloro livre presente no dióxido de cloro (ClO_2) e nas amostras de água adicionadas de ClO_2 foi utilizado o Colorímetro Digital Cheker (HANNA, HI701-0, Rio de Janeiro, RJ). Neste método, o composto N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD) foi usado como indicador onde a cor rosada característica se desenvolve em águas que não contêm iodeto e indica a presença de cloro residual livre. O DPD é oxidado pelo cloro livre, resultando numa solução com uma intensidade de cor proporcional à concentração de cloro livre. A determinação da concentração é realizada utilizando o colorímetro digital onde a absorção da solução resultante é medida por fotometria (Helbling e VanBriesen, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PFC 2³ para redução da contagem microbiana de *Salmonella Typhimurium* em água pura

No intervalo das faixas estudadas para a amplitude, tempo de aplicação e concentração de ClO_2 , as respostas obtidas para a contagem de *Salmonella Typhimurium* em água apresentaram-se muito próximas e sem efeito na redução, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Estimativa dos efeitos do PFC 2³ na redução da contagem microbiana de *Salmonella Typhimurium* em água pura.

Variável	Efeito	Erro padrão	t (3)	p-valor
Média	7,08	0,06	113,17	0,000*
Amplitude (x ₁)	-0,08	0,07	-1,14	0,334
Tempo de ultrassom (x ₂)	0,12	0,07	1,62	0,203
Concentração de ClO ₂ (x ₃)	-0,22	0,07	-2,87	0,063
x ₁ por x ₂	0,04	0,07	0,61	0,579
x ₁ por x ₃	-0,06	0,07	-0,91	0,429
x ₂ por x ₃	0,08	0,07	1,05	0,368

* p < 0,05. - Fonte: Autoria própria.

Conforme mostra a Tabela 3 pode-se visualizar a Anova do modelo com R² de 0,83, mostrando que a regressão não foi significativa, com um F_{calculado} de 2,11 e um F_{tabelado} de 8,88 concluindo que o modelo não foi válido.

Tabela 3 - Anova do modelo de PFC 2³ com as três variáveis independentes para *Salmonella Typhimurium*.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	0,17364	7	0,02481	2,11	8,88	0,2899*
Resíduos	0,03528	3	0,01176			
Total	0,20892	10	0,02089			

* p < 0,05. - Fonte: Autoria própria.

3.2 PFC 2² para redução da contagem microbiana de *Salmonella Typhimurium* em água pura

O PFC 2² foi realizado a partir dos resultados obtidos dos efeitos no PFC 2³, os quais indicaram que a amplitude não favoreceu a resposta desejada para a redução da contagem podendo ser fixada, o tempo de ultrassom mostrou ter um efeito positivo sendo necessário um melhor estudo sobre essa variável e a concentração de ClO₂ não mostrou ter efeito significativo a 5% de significância, porém a 7% de significância mostrou ter um efeito negativo na redução da contagem microbiana de *Salmonella Typhimurium*. Sendo assim, optou-se por estudar apenas duas variáveis independentes, o tempo de sonicação e a concentração de ClO₂. A amplitude de frequência foi fixada em 37 kHz e a temperatura da água do ultrassom em 30 °C, de acordo com o estudo de Zhang et al. (2019) que empregou ultrassom em sonda em meio líquido para a fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* e as frequências de 20, 23, 25, 28, 33 e 40 kHz; os autores observaram que frequências acima de 33 kHz causaram danos maiores nas células ocasionando taxas de mortalidade maior, enquanto abaixo dessa frequência estimularam o crescimento do microrganismo.

Os efeitos obtidos para o PFC 2² com as variáveis independentes estão apresentados conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 - Estimativa dos efeitos do PFC 2² na redução da contagem microbiana de *Salmonella Typhimurium* em água pura.

Variável	Efeito	Erro padrão	t (3)	p-valor
Média	4,55	0,04	105,22	0,0000*
Tempo de sonicação (x ₁)	1,12	0,09	12,97	0,0058*
Concentração de ClO ₂ (x ₂)	-5,09	0,09	-58,85	0,0002*
x ₁ por x ₂	1,10	0,09	12,81	0,0060*

* p < 0,05. - Fonte: Autoria própria.

As duas variáveis independentes tiveram efeitos no crescimento de *Salmonella Typhimurium*, a variável tempo de sonicação, ao passar do nível +1 para -1, gerou uma redução na contagem do patógeno. A concentração de ClO_2 teve um efeito negativo indicando que ao passar de 1 a 17 ppm houve uma redução na contagem de *Salmonella Typhimurium* em média 5 \log_{10} UFC/g.

Na Tabela 5 visualiza-se a Anova do modelo, com R^2 de 0,999 e R-ajustado de 0,998. Verifica-se que a regressão foi significativa, com um $F_{\text{calculado}}$ de 1929,78 e um F_{tabelado} de 9,12 ($p = 0,0002$), indicando que o modelo é válido.

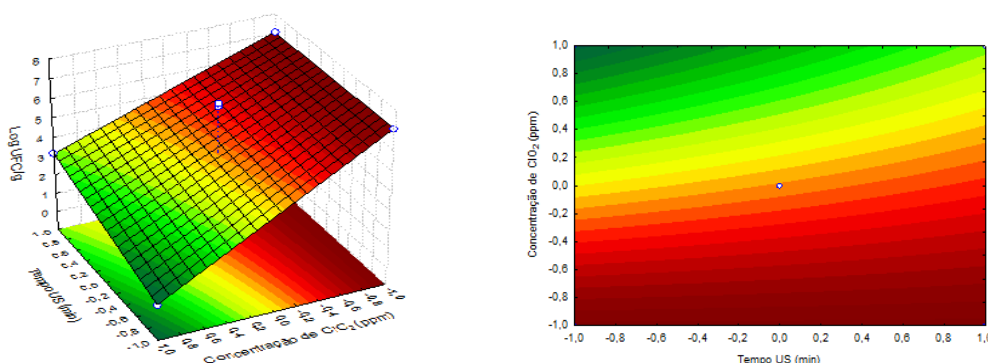
Tabela 5 - Anova do modelo de PFC 2² com as duas variáveis independentes.

	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	p-valor
Regressão	38,492760	3	9,62319	1929,78	9,12	0,000*
Resíduos	0,014960	3	0,00499			
Total	38,507720	6	5,5011			

* $p < 0,05$. - Fonte: Autoria própria.

A partir dos resultados, foi possível construir a superfície de resposta e a curva de contorno apresentadas na Figure 1.

Figura 1 - Superfície de resposta e curva de contorno PFC 2² empregando o ultrassom combinado com dióxido de cloro (ClO_2) na redução da contagem microbiana de *Salmonella Typhimurium*.



Fonte: Autoria própria.

Por meio da superfície de resposta pode-se concluir que a variável concentração de ClO_2 , ao passar do nível inferior para o superior, é a que mais influência na resposta redução de *Salmonella Typhimurium*; de forma adicional, quando a variável ClO_2 foi combinada com a variável tempo de ultrassom no nível inferior, apresentou efeitos maiores na a redução do patógeno.

3.3 Concentração de ClO_2 em água de “chiller”

Considerando que a água destilada ao ser adicionada de 17 ppm de ClO_2 apresentou um teor de cloro livre de 2,34 ppm, optou-se por validar o modelo utilizando a mesma concentração de cloro livre na água de “chiller”. Para isso, devido a matéria orgânica presentes na água de “chiller” foi necessária a adição de 30 ppm de ClO_2 para que o teor de cloro livre na água de “chiller” fosse de aproximadamente 2,34 ppm.

3.4 Validação do modelo do PFC 2² para redução da contagem microbiana de *Salmonella Typhimurium*



Para a validação do modelo proposto optou-se em fixar as variáveis independentes, sendo tempo de sonicação em 1 minuto e a concentração do ClO_2 em 30 ppm na água de “chiller” em três diferentes temperaturas conforme mostra a Tabela 6. As temperaturas foram escolhidas de acordo com o estabelecido pela Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998 que estabelece que a temperatura do tanque de pré-resfriamento deve ser de 16 °C e a do tanque de resfriamento de 4 °C (Brasil, 1998); de forma adicional, a temperatura de 25 °C foi escolhida para efeitos comparativos com os ensaios realizados nos PFCs.

Tabela 6 – Validação do modelo PFC 2² para a redução da contagem microbiana de *Salmonella Typhimurium*.

Ensaio	Variáveis				<i>Salmonella Typhimurium</i> (log ₁₀ UFC/g)
	Tempo de sonicação (min)	Concentração de ClO_2 (ppm)	Temperatura da água do ultrassom (°C)		
1	1	30	4		< 1,0 ± 0,00 ^b
2	1	30	16		2,56 ± 0,06 ^c
3	1	30	25		3,81 ± 0,03 ^d
Controle 1	-	-	-		7,50 ± 0,16 ^a
Controle 2	-	30	-		3,07 ± 0,09 ^e
Controle 3	1	-	25		7,61 ± 0,06 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si, a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. – Fonte: A autoria própria.

De acordo com os resultados obtidos, houve inibição da *Salmonella Typhimurium* na presença de ClO_2 a 30 ppm (2,34 ppm de cloro livre) e temperatura da água a 4 °C. Segundo estudo mostrado por Paniwnyk (2017), a temperatura do meio no qual o ultrassom é aplicado influencia no efeito sobre os microrganismos, sendo que temperaturas mais baixas apresentam melhores resultados.

4. CONCLUSÃO

O uso do ultrassom durante 1 min combinado com a adição de 30 ppm de ClO_2 inibiu totalmente a *Salmonella Typhimurium* na temperatura de 4 °C na água do “chiller” preparada por simulação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcon-Rojo, Ad., Janacua, H., Rodriguez, Jc., Paniwnyk, L., Mason, Tj., (2015) Ultra-som de potência no processamento de carne. *Meat science*, 107, 86-93.
- Associação Brasileira de Protéina Animal – ABPA. (2019). *Relatório Anual. 2019*, 176.
- Brasil, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (1998). *Portaria nº 210 de 10 de Novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves*, Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Helbling, D. E., & VanBriesen, J. M. (2007). Free chlorine demand and cell survival of microbial suspensions. *Water research*, 41(19), 4424-4434.
- Loretz, M., Stephan, R., and Zweifel C., (2010). Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: A literature survey, *Food Control*, 21 (1). 791–804.
- Munther, D., Sun, X., Xiao, Y., Tang, S., Shimozako, H., Wu, J., & Fazil, A. (2016). Modeling cross-contamination during poultry processing: Dynamics in the chiller tank. *Food control*, 59, 271-281.
- Paniwnyk, L. (2017). Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 794-806.
- Russel, S. M. (2012). Controle de Salmonella na produção e processamento de aves. *CRC Pressione*.
- Silva, F., Domingues, F. C., & Nerin, C. (2018). Trends in microbial control techniques for poultry products. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(4), 591-609.
- Skovgaard, N. (2010). Salmonella and Campylobacter in chicken meat, Meeting report, *Food Microbiol.*, 144 208–208.
- Zhang, Z., Xiong, F., Wang, Y., Dai, C., Xing, Z., Dabbour, M., & Ma, H. (2019). Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* in a one liter flask coupled with an external circulation ultrasonic irradiation slot: Influence of ultrasonic mode and frequency on the bacterial growth and metabolism yield. *Ultrasonics sonochemistry*, 54, 39