

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ANA PAULA IGLIKOWSKI BYLER

**INIBIÇÃO DA CONTAGEM DE *Salmonella* Typhimurium EM ÁGUA
PELA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM E AGENTES QUÍMICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MEDIANEIRA
2018

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

ANA PAULA IGLIKOWSKI BYLER

**INIBIÇÃO DA CONTAGEM DE *Salmonella* Typhimurium EM ÁGUA
PELA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM E AGENTES QUÍMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Departamento Acadêmico de alimentos – DAALM – pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Medianeira, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnóloga.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Canan

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Daneysa Lahis Kalschne

MEDIANEIRA
2018



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Medianeira
Diretoria de Graduação e Educação Profissional
Curso de Graduação em Tecnologia de Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

INIBIÇÃO DA CONTAGEM DE *Salmonella Typhimurium* EM ÁGUA PELA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM E AGENTES QUÍMICOS

por

ANA PAULA IGLIKOWSKI BYLER

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado às 15h30min do dia 29 de novembro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Tecnologia em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Profa. Dra. Cristiane Canan
Orientadora

Profa. Dra. Daneyssa Lahis Kalschne
Co-orientadora

Profa. Dra. Eliane Colla
Membro Titular

Prof. Dr. Valdemar Padilha Feltrin
Membro Titular

Medianeira, 29 de novembro de 2018.

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso.

*Pai, Mãe, Marli e Carol, vocês que diretamente
incentivaram minha educação formal,
A todos os irmão, de sangue ou não*

*Com carinho,
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

Sobre todas as coisas Deus, que sempre foi o motivo de minha fé. Que ensinou olhar a vida diferente. Que instruiu em todo tempo encontrar o lado bom das coisas e a não desistir.

À família, princípio gerador de tudo. Que investiram de uma forma incalculável, sem deixar faltar nada e fizeram parte de mim em tudo. Buscarei sempre honrá-los!

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Medianeira, que deu suporte estrutural durante todos os semestres da graduação, em especial no desenvolvimento deste Trabalho de Conclusão de Curso. E obrigada a todos os profissionais presentes.

À Orientadora Profa. Cristiane Canan, que começou acertando fazendo a melhor escolha de Co-orientadora, a Daneysa Lahis Kalschne, onde ao decorrer de todas as tarefas, ambas não mediram esforços e fizeram o que poucos professores fariam. Oportunidades acadêmicas como a iniciação científica, a orientação *in loco*, a paciência dos primeiros dias de laboratório, a todas as práticas exaustivas, a todos os conselhos diretos e indiretos. Não importa o lugar no mundo, eu sempre serei grata por tudo o que fizeram por mim.

Aos programas DEPET, PROGRAD e PROREC da UTFPR, pelo auxílio financeiro.

À Luiza Canci. Foi uma oportunidade e um prazer constante em aprender com tão grande profissional. Eu sou muito grata pelas experiências únicas como o estágio intenso como denomino, no laboratório do LAMAG. E que existam mais pessoas como você assim.

Ao James Morais, um grande amigo e irmão. Com um espírito de liderança da qual eu me espelho e que em todo tempo me inspirava a apontar para o alto, mas sempre com os pés bem firmes ao chão. Pela motivação no início do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos e pela oportunidade de ajuda com o estágio no Controle da Qualidade da Lar. Está oportunidade da qual até então foi onde eu encontrei o tema para este presente trabalho.

Ao Eduardo Morais, que fez parte de muitas experiências, boas e ruins. Raridade de encontrar alguém como você que faz as coisas com toda dedicação. Me manteve resiliente durante as perdas e comemorou comigo nos tempos de fatura. Tenho todo carinho por você.

A todos os Professores(as) do Curso de Graduação que me motivaram. Estes que fizeram eu descobrir além de um mundo novo ao redor um mundo a florado dentro de mim.

As amigas de graduação que se tornaram irmãs. Uma comunhão de modo tal com a qual nunca imaginei. Que esta amizade se consolide. Tenho orgulho de vocês.

Palavras não expressam toda minha gratidão, no entanto muito obrigada a todos!

Porque a sabedoria serve de defesa, como de defesa serve o dinheiro; mas a excelência do conhecimento é que a sabedoria dá vida ao seu possuidor.

(Eclesiastes 7:12)

BYLER A. P. I. INIBIÇÃO DA CONTAGEM DE *Salmonella* Typhimurium EM ÁGUA PELA APLICAÇÃO DE ULTRASSOM E AGENTES QUÍMICOS. 52 f. Trabalho de conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Medianeira, 2018.

RESUMO

A *Salmonella* sp. é considerada um dos patógenos mais preocupantes pela alta virulência e prevalência nos casos de infecção de origem alimentar em todo o mundo. Por isso, a indústria de alimentos aplica tratamentos térmicos para sua inativação. Entretanto, tendo em vista a inviabilidade da aplicação de altas temperaturas em muitos processos, desenvolveu-se o presente estudo. Objetivou-se avaliar o ultrassom (US) na inativação de *Salmonella* Typhimurium em água, utilizando água destilada como sistema modelo, livre de interferências e ausência de materiais em suspensão (proteína, lipídios, sangue e outros) ou US combinado com agentes químicos para verificar a potencialidade de inativação de *Salmonella* Typhimurium, em água de *chillers* de abatedouro de aves. O método avaliado na inibição foi não destrutivo e os agentes químicos avaliados foram o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o dióxido de cloro (ClO_2). Foram realizados três Planejamentos Fatoriais Completos (PFC) sendo: 1) PFC 2² em que as variáveis independentes foram amplitude de frequência de US 40% (-1) a 100% (+1) e tempo, 5 min (-1) a 15 min (+1); 2) PFC 2³, com as variáveis independentes amplitude de frequência de US 40% (-1) a 100% (+1), tempo, 5 min (-1) a 30 min (+1) e concentração de H_2O_2 de 1% (-1) a 9% (+1) e, 3) PFC 2³ em que apenas a variável concentração de H_2O_2 foi substituída pela variável concentração de ClO_2 de 1 ppm (-1) a 150 ppm (+1) em relação ao PFC realizado anteriormente. A resposta estudada foi a contagem de *Salmonella* Typhimurium (UFC mL⁻¹). O ultrassom isoladamente, estudado no PFC 2², não foi suficiente para demonstrar efeitos na resposta estudada ($p > 0,05$). No PFC 2³ combinando ultrassom com H_2O_2 as variáveis amplitude de frequência e concentração de H_2O_2 tiveram efeitos negativos significativos na redução da *Salmonella* Typhimurium ($p < 0,05$). Quando realizado o PFC 2³ combinando US com ClO_2 , notou-se que a resposta sofreu efeitos negativos significativos somente da concentração de ClO_2 ($p < 0,05$). A possibilidade da aplicação do banho de ultrassom industrialmente em águas de *chillers*, dentro das condições estudadas, com 37 kHz e os níveis de variações das amplitude de frequência isoladas e tempo, não foram eficientes na inibição do patógeno. Em contrapartida, concluiu-se que a adição de 74,5 ppm (0, ponto central) e 150 ppm (+1) de ClO_2 , foram eficientes na eliminação total de 9,73 log UFC mL⁻¹ de *Salmonella* Typhimurium.

Palavras-chave: Água. Amplitude de frequência. Dióxido de cloro. Peróxido de hidrogênio. *Salmonella* Typhimurium.

BYLER, A. P. I. INHIBITION OF THE COUNT OF *Salmonella* Typhimurum IN WATER BY THE APPLICATION OF ULTRASOUND AND CHEMICAL AGENTS. 52 f. Trabalho de conclusão de Curso – Curso Superior de Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Medianeira, 2018.

ABSTRACT

Salmonella sp. is considered one of the pathogens more important of higher virulence and prevalence in the cases of infections of food origin worldwide. Therefore, the food industry applies heat treatments for inactivation. However, in view of the inviability of the high temperature application in many processes, the present study was developed. The objective was to evaluate the ultrasound (US) in the *Salmonella* Typhimurium inactivation in water, using distilled water as the model system, free of interference and absence of suspended materials (protein, lipids, blood and other) or US combined with chemical agents to verify potentiality of *Salmonella* Typhimurium inactivation, in poultry slaughterhouse *chiller* water. The method evaluated in the inhibition was non-destructive and the chemical agents evaluated were hydrogen peroxide (H₂O₂) and chlorine dioxide (ClO₂). Three full factorial designs (PFC) were realized: 1) PFC 2² in which the independent variables were sonication amplitude of 40% (-1) to 100% (+1) and time, 5 min (-1) to 15 min (+1); 2) PFC 2³, with independent variables sonication amplitude of 40% (-1) to 100% (+1), time, 5 min (-1) to 30 min (+1) and H₂O₂ concentration from 1% (-1) to 9% (+1) and, 3) PFC 2³ in which only the H₂O₂ concentration was replaced by the ClO₂ concentration of 1 ppm (-1) to 150 ppm (+1) in relation to the PFC realized previously. The response studied was the count of *Salmonella* Typhimurium (UFC mL⁻¹). Ultrasound isolated, studied in PFC 2², was not enough to demonstrate effects on the response studied (p > 0.05). In PFC 2³ combining US with H₂O₂, the variables sonication amplitude and H₂O₂ concentration had significant negative effects in *Salmonella* Typhimurium reduction (p < 0.05). When the PFC 2³ was performed combining US with the ClO₂, it was observed that the response was negatively affected by the effect of ClO₂ concentration (p < 0.05). The possibility of applying the ultrasound bath industrially in *chillers* waters, to *chillers*, on the conditions studied at 37 kHz and the levels of sonication amplitude and time variations were not efficient in inhibiting the pathogen. In contrast, it was concluded that addition of 74.5 (0, center point) and 150 ppm (+1) of ClO₂ were completely efficient in *Salmonella* Typhimurium (9.73 log CFU mL⁻¹) elimination.

Keywords: Water. Sonication amplitude. Chlorine dioxide. Hydrogen peroxide. *Salmonella* Typhimurium

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do Processamento de Aves.	17
Figura 2 – Esquema da Geração e Colapso de uma Bolha de Cavitação Acústica.	22
Figura 3 – Esquema das Faixas de Frequência de Som.....	24
Figura 4 – Fluxograma Geral do Processo de Inativação de <i>Salmonella</i> Typhimurium pelo Uso do Ultrassom.....	32
Figura 5 – Layout do Ultrassom com as Medidas e Localizações Reais Utilizados dos Erlenmeyer Acondicionados dentro do Banho Ultrassônico.....	33
Figura 6. (a) Curva de Crescimento da <i>Salmonella</i> Typhimurium Preditada pelo Modelo de Gompertz Modificado; (b) Curva de Crescimento da <i>Salmonella</i> Typhimurium Preditada pelo Modelo Logístico.....	37
Figura 7 – Superfície de Resposta e Curva de Contorno PFC 2 ³ Empregado o Ultrassom Combinado com Peróxido de Hidrogênio.	40
Figura 8 – Concentração de Permanganato de Potássio Usado para Amostra com Sonicação no Ultrassom e Outra na Ausência do Tratamento.....	41
Figura 9 – Superfície de Resposta e Curva de Contorno PFC 2 ³ Empregado o Ultrassom Combinado com Dióxido de Cloro.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis e Níveis de Variação do PFC 2 ² com Ultrassom Isoladamente.	30
Tabela 2 – Variáveis e Níveis de Variação dos PFC 2 ³ com Ultrassom e Peróxido de Hidrogênio.....	31
Tabela 3 – Variáveis e Níveis de Variação dos PFC 2 ³ com Ultrassom e Dióxido de Cloro. .	31
Tabela 4 – Parâmetros de Crescimento Preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico.....	35
Tabela 5 – Parâmetros de Crescimento Preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico.....	36
Tabela 6 – Matriz dos Ensaios do PFC 2 ² com as Variáveis Independentes Reais e Codificadas e Resposta para Inibição da <i>Salmonella</i> Typhimurium.	38
Tabela 7 – Estimativa dos Efeitos do PFC 2 ² Empregando o Ultrassom Isoladamente.....	38
Tabela 8 – Matriz dos Ensaios do PFC 2 ³ com as Variáveis Independentes Reais e Combinando Ultrassom e Peróxido de Hidrogênio e Resposta para Inibição da <i>Salmonella</i> Typhimurium.	39
Tabela 9 – Estimativa dos Efeitos do PFC 2 ³ Empregando o Ultrassom Combinado com Peróxido de Hidrogênio.....	39
Tabela 10 – Anova do Modelo do PFC 2 ³ Empregando o Ultrassom Combinado com Peróxido de Hidrogênio.	40
Tabela 11 – Matriz dos Ensaios do PFC 2 ³ com as Variáveis Independentes Reais e Codificadas Combinando Ultrassom e Dióxido de Cloro e Resposta para Inibição da <i>Salmonella</i> Typhimurium.	43
Tabela 12 – Estimativa dos Efeitos do PFC 2 ³ Empregando o Ultrassom Combinado com Dióxido de Cloro.	43
Tabela 13 – Anova do Modelo do PFC 2 ³ Empregando o Ultrassom Combinado com Dióxido de Cloro.	44

SUMÁRIO

1 INTODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 A ÁGUA COMO VEÍCULO DE CONTAMINAÇÃO CRUZADA EM ABATEDOUROS AVÍCOLAS	16
3.1.1 Considerações Microbiológicas dos <i>Chillers</i> de Pré-Resfriamento de Carcaças	18
3.2 MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NAS CARÇACAS DE AVES DESTINADAS AO ABATE.....	19
3.2.1 <i>Salmonella</i> : Uma das Principais Preocupações da Contaminação Alimentar e Bloqueio nas Exportações de Carne de Aves	20
3.3 AÇÃO DO ULTRASSOM NA INATIVAÇÃO MICROBIANA EM MEIO LIQUÍDO .	21
3.4 AGENTES QUÍMICOS DE POTÊNCIAL APLICAÇÃO EM ÁGUAS PARA INATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	25
3.4.1 Peróxido de Hidrogênio.....	25
3.4.2 Dióxido de Cloro	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 MICRO-ORGANISMO, MEIO DE CULTURA E REAGENTES QUÍMICOS	29
4.2 REATIVAÇÃO DA CEPA DE <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	29
4.3 EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL	30
4.3.1 Aplicação do Ultrassom	33
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	33
4.4.1 Método Titulométrico Para Determinação de H ₂ O ₂ em Água	33
4.4.2 Contagem de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 CURVA DE CRESCIMENTO da <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	35

5.2 PFC 2 ² PARA AVALIAÇÃO DO ULTRASSOM ISOLADAMENTE NA INIBIÇÃO DA <i>Salmonella</i> Typhimurium	37
5.3 PFC 2 ³ PARA AVALIAÇÃO ULTRASSOM COMBINADO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA INIBIÇÃO DA <i>Salmonella</i> Typhimurium	38
5.3.1 Decomposição de Peróxido de Hidrogênio	41
5.4 PFC 2 ³ PARA AVALIAÇÃO DO ULTRASSOM COMINADO COM DIÓXIDO DE CLORO NA INIBIÇÃO DA <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	42
6 CONCLUSÕES.....	46
SUGESTÕES TRABALHOS FUTUROS	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTODUÇÃO

A *Salmonella* é uma das principais causas de doenças humanas transmitidas por alimentos em todo o mundo, entretanto, pouco se sabe sobre sua ocorrência e características genômicas em fontes alimentares em muitos países em desenvolvimento (WHO, 2017; HARB et al., 2018).

Segundo Majowicz et al. (2010) o número de casos de infecções por *Salmonella* em humanos, tanto em países desenvolvidos como e em desenvolvimento, é elevado e comumente associado a alimentos e águas contaminadas. Desta forma, destaca que são necessários esforços crescentes para a redução da transmissão global de *Salmonella* sp., pois estima-se que a cada ano ocorrem 155 mil mortes de origem bacteriana por *Salmonella* sp., sujeito indivíduos a óbito em todo o mundo.

Somente no Iraque, foram coletadas 400 amostras de carcaças de frango congeladas oriundas de importação. Um total de 46 amostras apresentaram contaminação por *Salmonella* sendo a *Salmonella* Typhimurium a predominante, cuja prevalência foi de 30,4% dentre os 14 sorotipos diferentes recuperados (HARB et al., 2018).

O volume de água nos sistemas de pré-resfriamento de aves, além melhorar as propriedades tecnológicas das carcaças e causar a redução da temperatura pelo contato ocorrente pela água do *chiller*, ao mesmo tempo é vista como um importante veículo de contaminação de *Salmonella* sp., sendo caracterizado pela análise de perigo e ponto crítico de controle (APPCC), como um perigo biológico (PCC - B) (PETRAK et al., 1999, MAPA, 1998;2005, DEPNER, 2015, LOPES et al., 2007 e MUNTHER et al., 2016).

Os cuidados com a carne de frango são importantes devido principalmente ao elevado valor nutricional e baixo teor de gordura, e por estas características é uma das mais populares em todo o mundo. Por isso, o consumo global em 2025 deverá atingir mais de 130 milhões de toneladas conforme previsto pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico e a Organização para a Alimentação e Agricultura (OECDFAO) (WANG et al., 2018). Sendo assim, a produção e a exportação brasileira de carne de frango deverão alcançar em 2018 3,34% a mais que 2017 (CEPEA, 2018).

Após reconhecer e entender a importância econômica e comercial que a carne de frango oferece para o país e principalmente para a região oeste do Paraná, estudos que visam melhorar a qualidade desta matéria-prima devem ser continuamente realizados. Contudo, até mesmo

WHO (2017), imputa que o fornecimento seguro dos alimentos contribui para a economia nacional, contribui para a segurança alimentar, aspecto nutricional e fortalece o desenvolvimento sustentável de cada país.

A Segunda Conferência Internacional sobre Nutrição realizada em Roma em 2014, reiterou a importância da segurança alimentar para alcançar uma nutrição humana melhor. Garantir a segurança alimentar é, portanto, uma chave para atingir os objetivos de desenvolvimento sustentável. Logo, os governos devem fazer disso uma prioridade de saúde pública, pois desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de políticas e marcos regulatórios (WHO, 2017).

Flores et al. (2018) demonstraram pela primeira vez o efeito da aplicação do US durante o pré-resfriamento de frango, e dentre os resultados obtidos concluíram de modo geral, que, o US é uma tecnologia de grande potencial para ser utilizada neste processo. Além disso, essas condições proporcionaram um resfriamento mais uniforme e aumentaram a absorção de água dos peitos de frango. Todavia, mais estudos são necessários para avaliar os efeitos da tecnologia emergente no emprego industrial por US no pré-resfriamento, no que diz respeito à qualidade microbiológica, oxidativa e sensorial da carne de frango.

Após a revisão da literatura, conclui-se que o US é uma ferramenta útil para a indústria, pois apresenta inúmeras funcionalidades: além de melhorar as diversas propriedades funcionais na carne, promove principalmente a inibição microbiana. Pelo fato de US ser uma tecnologia emergente, inúmeros esforços precisam ser realizados para que este sistema possa desenvolver-se e ser implementado em um nível industrial completo (ALARCON-ROJO et al. 2015).

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencialidade de inativar a *Salmonella* Typhimurium pelo uso do ultrassom isoladamente ou combinado com peróxido de hidrogênio ou com dióxido de cloro em água.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir a curva de crescimento de *Salmonella* Typhimurium.
- Ajustar os dados experimentais da curva de crescimento da *Salmonella* Typhimurium ao modelo de Gompertz modificado e modelo Logístico.
- Estimar a redução da contagem de *Salmonella* Typhimurium na água utilizando ultrassom isoladamente aplicando-se um PFC 2².
- Avaliar a combinação da aplicação do ultrassom e peróxido de hidrogênio na redução da contagem de *Salmonella* Typhimurium através de um PFC 2³.
- Avaliar a combinação da aplicação do ultrassom e dióxido de cloro na redução da contagem de *Salmonella* Typhimurium através de um PFC 2³.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A ÁGUA COMO VEÍCULO DE CONTAMINAÇÃO CRUZADA EM ABATEDOUROS AVÍCOLAS

A legislação brasileira em vigência (BRASIL, 1998) determina que a temperatura máxima da água do pré-*chiller* seja de 16 °C e do *chiller* de até 4 °C, e que o nível de cloro livre na água deve ser no máximo de 5 ppm não havendo limite mínimo estabelecido, tendo um fluxo de água por carcaça com peso entre 2,5 e 5,0 kg de no mínimo 1,5 L no pré-*chiller* e 1,0 L no *chiller*.

O processo de resfriamento influencia a qualidade final das carcaças de frango, que é realizada na indústria avícola predominantemente por imersão em água gelada, em duas etapas denominadas pré-resfriamento e resfriamento, sendo que o binômio tempo e temperatura da água utilizada nos banhos de imersão nestes estágios podem levar a mudanças bioquímicas e estruturais na carne de frango, que afeta diretamente a vida útil (PETRAK et al., 1999).

Apesar dos avanços tecnológicos na indústria cárnea, a manutenção do controle higiênico-sanitário de equipamentos e utensílios usados durante o processamento de alimentos são um problema e podem oferecer risco de contaminação cruzada se não forem devidamente higienizados e conseqüentemente, afetam o prazo de validade e a segurança do produto (MAPA, 1998; 2005).

Algumas etapas do processo de abate favorecem a disseminação de micro-organismos, por isso o uso de sanitizantes na água de tanques de pré-resfriamento pode contribuir com a redução de micro-organismos deteriorantes e patógenos (DEPNER, 2015). A ICMSF (2000) define como pontos críticos de controle (PCC) do abate de aves a escalda, a lavagem após depenagem, a evisceração, a lavagem de carcaças após a evisceração e o pré-resfriamento.

A indústria avícola deve estar consciente de que há muito por ser feito no sentido de garantir melhor qualidade microbiológica de seus produtos, o que certamente incluirá a adoção de práticas de implantação de tecnologia visando atingir estes objetivos em toda a cadeia de produção (SOUZA et al., 2014). A seguir está apresentado um fluxograma das etapas geralmente encontradas em um processo de abate de aves (Figura 1).

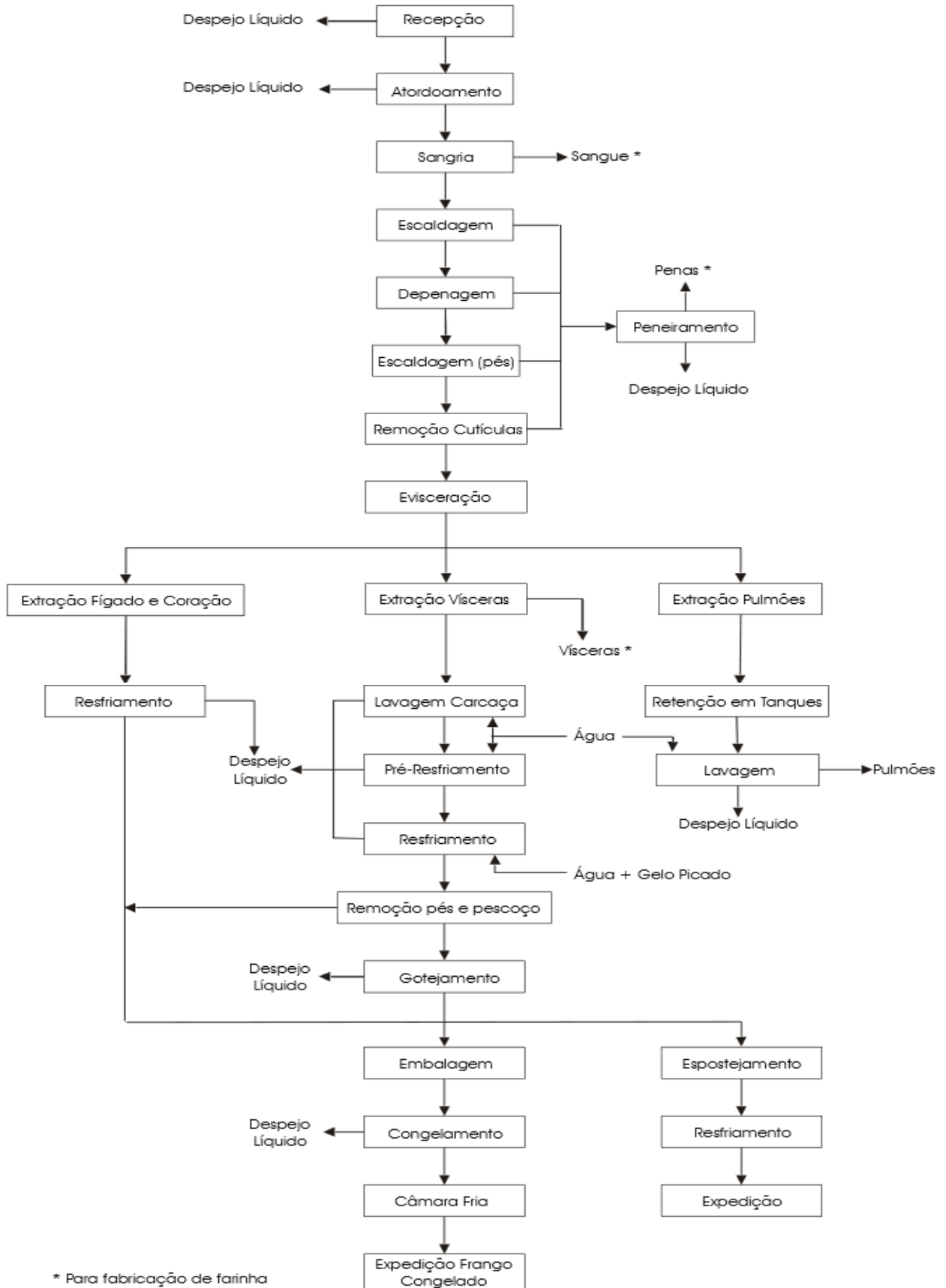


Figura 1 – Fluxograma do Processamento de Aves.
 Fonte: Facta (1994).

3.1.1 Considerações Microbiológicas dos *Chillers* de Pré-Resfriamento de Carcaças

Os micro-organismos encontrados na carne de aves derivam da microbiota da pele e penas desses animais e podem se originar da cavidade nasal, boca, pele e trato gastrointestinal dos manipuladores. Logo, bactérias presentes nas superfícies de equipamentos, utensílios e recipientes podem ser fontes de contaminação de alimentos (CINTRA et al., 2016).

Conforme as carcaças entram e se movem através do tanque do *chiller*, elas liberam grandes quantidades de material orgânico na forma de sangue, gordura, proteína e outros na água (MUNTHEER et al., 2016). Esse material orgânico altera a composição química da água de resfriamento de carcaças de aves e afeta diretamente a contagem microbiana (RUSSELL, 2012). Para isto, ter o entendimento da dinâmica da carga microbiana média das aves e do material orgânico desprendido no tanque do resfriador é importante para compreender as questões microbiológicas propagadas entre as carcaças, sempre deixando claro o volume do tanque e a quantidade da matéria orgânica espalhada (MUNTHEER et al., 2016).

Assim, a fixação bacteriana ocorre pelo contato entre uma carcaça e micro-organismos na água dos resfriadores. Para simplificar assume-se que a quantidade de matéria orgânica que chega à água é proporcional à taxa de entrada das memas nos *chillers* (MUNTHEER et al., 2016). Por isso que o contato de cloro com micro-organismos aderidos às superfícies das carcaças deve ser significativamente menor que o contato de cloro com contaminação na água do *chiller* (MCCARTHY et al., 2017).

Segundo Lopes et al. (2007), *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores, coliformes totais, coliformes termotolerantes, aeróbios mesófilos e micro-organismos psicotróficos, foram encontrados em carcaças de frango e na água dos tanques de pré-resfriamento em um frigorífico do norte do Paraná. Nas carcaças de frango antes do pré-*chiller* e após o *chiller* e, na água do pré-*chiller* e no *chiller*, não foi observada diferença significativa nos índices de contaminação com relação aos micro-organismos indicadores estudados, concluindo que não houve redução da contaminação bacteriana das carcaças durante a passagem pelos tanques de resfriamento (LOPES et al., 2007).

Se tratando de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), segundo a Organização Mundial da Saúde, 25% dos surtos de origem alimentar estão intimamente associados a eventos de contaminação cruzada envolvendo práticas de higiene deficiente, equipamentos contaminados, contaminação por manipuladores de alimentos, processamento ou armazenamento (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012).

Segundo Munther et al. (2016) a compreensão dos mecanismos de contaminação cruzada durante o processamento de frango é vital para o controle efetivo dos patógenos. Entretanto, embora o controle do cloro seja importante para reduzir os níveis de alguns micro-organismos durante o resfriamento, ele não desempenha um papel muito significativo.

O processamento tem sido destacado como um ponto crucial no fornecimento da cadeia avícola, tanto para prevenir e potencialmente promover a contaminação cruzada, deste modo, pesquisadores realizaram inúmeros estudos, tentando determinar a prevalência e concentração de patógenos em vários estágios do processamento (MUNTHER et al., 2016).

Como o crescimento de micro-organismos em alimentos depende de fatores extrínsecos e intrínsecos, uma série de padrões e técnicas devem ser seguidas nas indústrias de abate e processamento de aves para minimizar a contaminação das carcaças (CINTRA et al., 2016).

3.2 MICRO-ORGANISMOS PRESENTES NAS CARÇACAS DE AVES DESTINADAS AO ABATE

Alguns autores relatam que mais de $4,5 \log \text{ UFC g}^{-1}$ de micro-organismos são normalmente encontrados em carcaças de aves inteiras, pois toda linha de abate inclui vários procedimentos frequentemente associados à contaminação cruzada por bactérias, como a depenagem, a evisceração, a lavagem e o resfriamento (BARTENFELD et al., 2014; DUAN et al., 2017; KIM et al., 2018).

O Ministério da Agricultura (MAPA) estabelece três micro-organismos patógenos para serem analisados com prioridade, são eles: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. (NEOPROSPECTA, 2017).

Segundo WHO (2017), a carne de frango é um alimento propício para desenvolvimento microbiano de *Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli* enterohemorrágica, que estão entre os patógenos alimentares mais comuns que afetam milhões de pessoas anualmente, muitas vezes com desfechos graves e fatais. Os sintomas da infecção por *Salmonella* sp. são febre, dor de cabeça, náusea, vômito, dor abdominal e diarreia. Exemplos de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose são ovos, aves e outros produtos de origem animal.

Os casos de *Campylobacter* transmitidos por alimentos são principalmente causados por leite cru, aves crus ou mal cozidas e água potável. *Escherichia coli* entero-hemorrágica está associada o leite não pasteurizado, carne mal cozida e frutas e vegetais frescos. A listeriose, é uma infecção gerada pela *Listeria monocytogenes*, que leva a abortos não planejados em mulheres grávidas ou a morte de recém-nascidos. Embora a ocorrência da doença seja

relativamente baixa, as consequências são graves e, por vezes, fatais para a saúde particularmente entre bebês, crianças e idosos destacando-se entre as mais graves infecções transmitidas por alimentos (WHO, 2017).

A carga microbiana de carcaças de aves e seus derivados são representados por uma microbiota oriunda, principalmente, das aves vivas ou incorporadas em qualquer uma das fases do abate, sendo as mais críticas a escaldagem, a depenagem e a evisceração. O problema se agrava pelo fato de bactérias, incluindo *Salmonella* sp., aderirem firmemente na pele da carcaça de aves, não sendo facilmente removidas pela lavagem. A pele de aves pode carregar diversos organismos deteriorantes: *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter-Moraxella* spp., *Enterobacter* spp., *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta* e *Lactobacillus* spp. O patógeno *Campylobacter jejuni* também pode estar presente na pele e, conseqüentemente, ser transferido para pessoas que trabalham com carne de frangos (SOUZA et al., 2014).

3.2.1 *Salmonella*: Uma das Principais Preocupações da Contaminação Alimentar e Bloqueio nas Exportações de Carne de Aves

Segundo WHO (2018), dentre os micro-organismos patogênicos importantes em aves, capazes de causar zoonose de origem alimentar em humanos, destaca-se a *Salmonella* (WHO/FAO, 2009), gênero de bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A *Salmonella* é uma bactéria onipresente e resistente que pode sobreviver várias semanas em um ambiente seco e vários meses na água.

A resistência antimicrobiana é um problema de saúde pública global e a *Salmonella* é um dos micro-organismos em que emergiram alguns sorotipos resistentes, afetando a cadeia alimentar. As doenças transmitidas por alimentos podem ser graves, especialmente em crianças pequenas. A *Salmonella* é amplamente distribuída e prevalente em alimentos, como aves, suínos e bovinos, e em animais de estimação, incluindo gatos, cães, pássaros e répteis, como tartarugas. A *Salmonella* pode passar por toda a cadeia alimentar, desde a alimentação animal, a produção primária até os domicílios, estabelecimentos de alimentação e instituições (WHO, 2018).

A capacidade patogênica deste micro-organismo pode ser distinguida pela virulência dos genes que eles carregam, e até o momento, mais de 2600 sorotipos foram relatados. Alguns sorovares também podem ser encontrados dentro de um país ou região por um período e depois desaparecem sem nenhuma causa óbvia ou medida de intervenção (LUO et al., 2018).

O Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) conduziu um estudo de prevalência nacional de *Salmonella* spp. em carcaças de aves realizado entre 2013 e 2014. Foram analisadas 856 amostras coletadas em 89 abatedouros, sendo que em 150 foi identificada *Salmonella* spp., o que representa 17,2% (MAPA, 2016).

Tradicionalmente, a *Salmonella* é considerada suscetível a antimicrobianos. No entanto, durante as últimas décadas, a resistência antimicrobiana emergiu e evoluiu em muitas bactérias, como o uso excessivo de antibióticos em humanos (LUO et al., 2018).

O acesso a quantidades suficientes de alimentos seguros e nutritivos é fundamental para sustentar a vida e promover a boa saúde. Estima-se que 600 milhões - quase 1 em cada 10 pessoas no mundo - adoecem depois de ingerir alimentos contaminados e 420 mil morrem a cada ano. As doenças diarréicas são as mais comuns resultantes do consumo de alimentos contaminados, causando 550 milhões de pessoas doentes e 230.000 mortes por ano. Por isso, a segurança alimentar e nutrição estão intrinsecamente ligadas (WHO, 2017).

Devido a ocorrência de *Salmonella* spp., determinou-se o seu controle em toda a cadeia de produção de frangos e perus, incluindo estabelecimentos avícolas comerciais e os estabelecimentos de abate, onde se estabeleceu que os mesmos instituem em seus programas de autocontrole as ações de controle e monitoramento de *Salmonella* spp. desde a obtenção da matéria-prima até o produto final (MAPA, 2017).

Assim, a minimização da contaminação microbiana em carcaças é importante durante o processamento de abate, por retardar a deterioração da carne e prolongar seu prazo de validade (WANG et al., 2018).

3.3 AÇÃO DO ULTRASSOM NA INATIVAÇÃO MICROBIANA EM MEIO LIQUÍDO

O uso do ultrassom no processamento de alimentos pode ser aplicado para promover o aumento da qualidade e segurança dos alimentos (ALARCON-ROJO et al., 2015). Cichoski et al., (2015) descreve que o uso de ultrassom tem sido relatado como um processo atraente na indústria de carnes com efeito positivo no processamento e preservação de alimentos.

O ultrassom é tecnologia inovadora com aplicações tanto na análise quanto na modificação de alimentos, definida como ondas sonoras superiores àquelas que podem ser detectadas pelo ouvido humano (20 kHz). As faixas de som usadas são divididas em ultrassom de alta frequência e baixa intensidade (> 1 MHz, < 1 W cm⁻²) e ultrassom de baixa frequência e alta intensidade (20 – 100 kHz com 10–1000 W cm⁻²). Ambos os tipos são úteis na tecnologia de alimentos (ALARCON-ROJO et al., 2015).

Como qualquer onda sonora, o ultrassom é propagado através de uma série de ondas (PANIWNYK, 2014), gerando compressão e rarefação induzidas nas moléculas do meio através do qual ele passa (PANIWNYK, 2017). Essas cavidades crescem com ciclos subsequentes de ultrassom e, eventualmente, tornam-se instáveis e colapsam liberando altas temperaturas e pressões. Se este colapso estiver dentro de um material biológico, o ultrassom pode afetar esses materiais biológicos e tecidos em micro e macro escala (ALARCON-ROJO et al., 2015).

As ondas ultrassônicas geradas pelo equipamento ultrassônico são introduzidas no material através de um elemento emissor com uma determinada dimensão e que vibra com uma certa frequência (ANDREUCCI, 2003).

É importante salientar que este colapso da bolha, tem uma variedade de efeitos dentro do sistema dependendo do tipo de material envolvido. E cada bolha afetará levemente o campo localizado das bolhas vizinhas distribuídas por todo o líquido, que crescem ao longo do período de alguns ciclos até um tamanho de equilíbrio para a frequência particular aplicada (PANIWNYK, 2014). Se a amplitude de frequência (%) de som aplicada for de intensidade suficiente, serão produzidos vazios dentro do líquido, induzindo efeitos mecânicos, químicos e bioquímicos em líquidos através da produção e subsequente o colapso de bolhas de cavitação (Figura 02) (PANIWNYK, 2017).

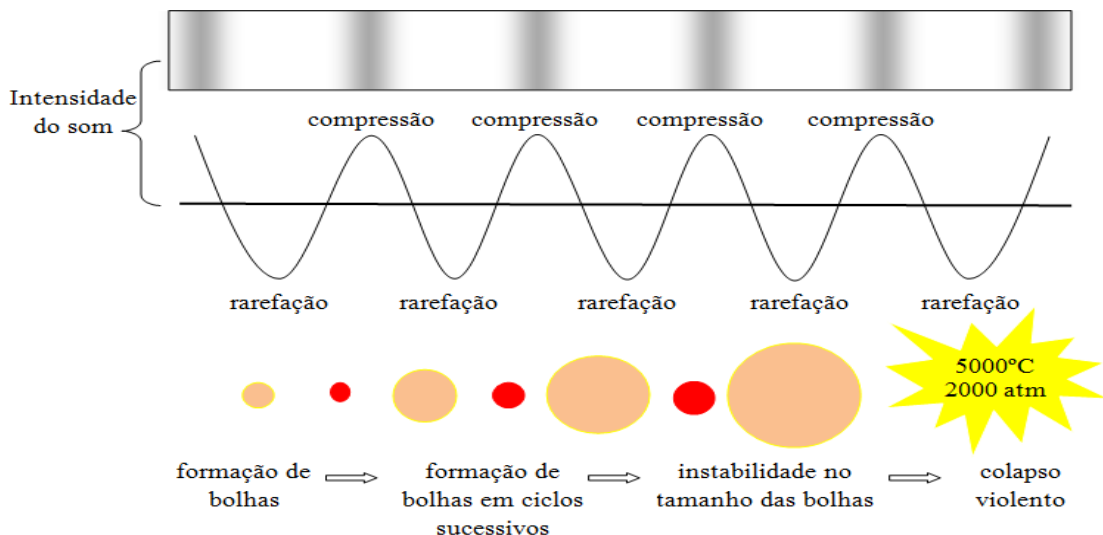


Figura 2 – Esquema da Geração e Colapso de uma Bolha de Cavitação Acústica.
Fonte: Mason, (2009).

Derivado da onda sonora, por definição física a cavitação é a ruptura de um líquido submetido a pressões negativas. Em gases como o ar, que são fluidos compressíveis, o

movimento do fluido nos padrões de fluxo contínuo é sempre suficiente para acomodar variações de pressão (ASHOKKUMAR; KENTISH, 2011).

Muitas vezes, o ultrassom é usado para esterilizar líquidos tão diversos quanto o leite. Vários estudos demonstraram a capacidade do ultrassom de inativar micro-organismos e enzimas deteriorantes e patogênicos em produtos lácteos e sucos de frutas. Isto é frequentemente atribuído ao enfraquecimento das membranas da parede celular, à formação de pontos quentes localizados e à produção de radicais livres no meio em massa. Também é afirmado que o uso de ultrassom produz forças que resultam no rompimento da parede celular de micro-organismos (PANIWNYK, 2017).

Por esta razão existem duas zonas principais nas quais o colapso da cavitação pode influenciar tais sistemas: no líquido imediatamente ao redor da bolha, onde o rápido colapso da bolha gera forças de cisalhamento que podem produzir efeitos mecânicos; e na própria bolha, onde qualquer espécie introduzida durante sua formação será submetida a condições extremas de temperatura e pressão no colapso, levando a efeitos químicos (PANIWNYK, 2014).

O primeiro é não destrutivo usado para análise ou caracterização de compostos, enquanto o último pode ser usado para modificar estruturas celulares e em vários outros processos, como inibição de espuma, emulsificação, inibição ou ativação de enzimas e cristalização (MASON; PANIWNYK; LORIMER, 1996; MASON; PANIWNYK; ABERT, 2011 *apud* ALARCON-ROJO et al., 2015).

As principais frequências usadas para o processamento ultrassônico estão na faixa de 20 a 25 kHz. Deste modo, uma onda acústica (som) é uma propagação de oscilação de pressão em meio, tal como ar ou água líquida com a velocidade do som (YASUI, 2011; PANIWNYK, 2017).

Os banhos do equipamento ultrassônico operam em uma faixa de frequências ultrassônicas variando de 20 kHz a mais de 1 MHz, enquanto as sondas ainda predominam na faixa de 20 a 40 kHz e como resultado são capazes de emitir energia ultrassônica mais alta (PANIWNYK, 2014).

O som é formado por sons extremamente graves ou agudos e podem passar despercebidos pelo aparelho auditivo humano, não por deficiência deste, mas por caracterizarem vibrações com frequências muito baixas, até 20Hz (infrassom) ou com frequências muito altas acima de 20 kHz (ultrassom), ambas inaudíveis (ANDREUCCI, 2003). Contudo, pode-se ter uma ideia da frequência do ultrassom em relação à sensibilidade do ouvido humano (Figura 3).

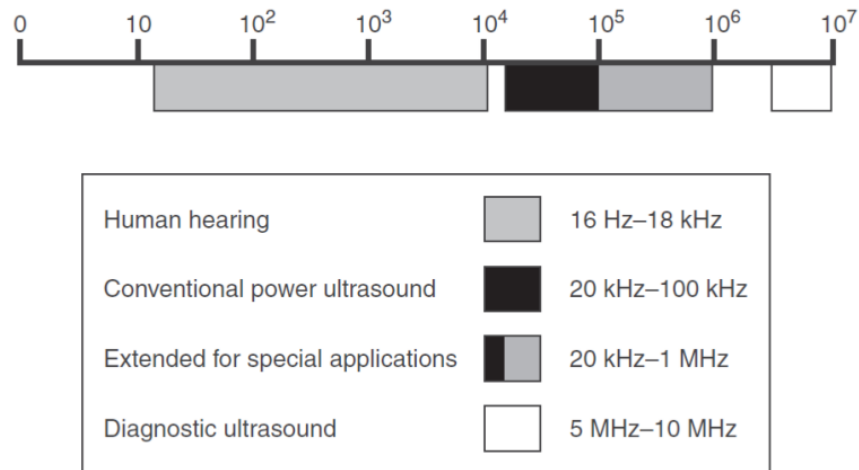


Figura 3 – Esquema das Faixas de Frequência de Som.
Fonte: Paniwnyk, (2014).

Paniwnyk (2017) descreve que um dos benefícios do uso do ultrassom é seu desempenho aprimorado em temperaturas mais baixas em comparação com outros métodos de processamento de líquidos. O uso de temperaturas mais altas durante o processamento leva à degradação de muitos compostos nutricionalmente benéficos e pode resultar em degradação oxidativa de muitos outros. No caso da *Salmonella* sp, a bactéria é sensível ao calor, não sobrevivendo à temperatura superior a 70 °C (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Por isso a tecnologia sugere ser eficiente agindo até mesmo em temperaturas mais baixas, sendo que o ultrassom demonstrou reter muitos ingredientes bioativos tanto imediatamente após o processamento como também durante o armazenamento (PANIWNYK, 2017).

Segundo Cichoski et al. (2015) além da etapa de desinfecção, a redução do impacto do processamento na qualidade da carne é desejável em processos alternativos ou auxiliares desenvolvidos para superar essas limitações. Algumas tecnologias, tais como aquecimento de alta frequência (por exemplo, microondas, radiofrequência), campos elétricos pulsados, luz UV pulsada e processamento de alta pressão foram propostos.

Métodos alternativos de processamento de alimentos que têm uma influência quase nula na qualidade dos alimentos tornaram-se mais importantes devido ao aumento da demanda do consumidor por alimentos minimamente processados. O processamento de ultrassom é uma tecnologia alternativa que se mostrou promissora neste campo. Com a tecnologia de ultrassom, pode-se destruir membranas celulares e DNA, levando à morte celular (CHANG et al., 2012).

No processamento de carne, o ultrassom de amplitude de frequência pode modificar as membranas celulares, o que pode ajudar a curar, marinar, secar e amaciar o tecido. No entanto,

esses processos precisam ser desenvolvidos antes que possam ser implementados em um nível industrial completo (ALARCON-ROJO et al., 2015).

Lawson et al. (2009), abordaram custos para controle de patógenos baseados na perspectiva da cadeia desde a produção primária até as carcaças que saem de um abatedouro de suínos, e concluíram que o uso do ultrassom é tanto um método eficaz como de baixo custo. No entanto, este método por si só não possui ativação suficiente para atuar, mas a utilização de outros componentes em conjunto pode corroborar para atingir resultados melhores.

Por exemplo, o uso de sanitizantes como o dióxido de cloro no estudo de Aday e Caner (2014) para aumentar a vida útil de morangos, asseguraram que com o uso do ultrassom a eficácia dos desinfetantes na qualidade do fruto foi maior, obtendo um melhor desempenho na redução de micro-organismos.

A adaptação do projeto no uso de US é relativamente simples de ser executado em equipamentos convencionais usados na indústria e tem potencial para processamento contínuo e aumento de escala. Como não há informações disponíveis sobre a possível geração de substâncias tóxicas após o processamento de ultrassom, outras investigações devem ser realizadas antes da expansão industrial do processo (CICHOSKI et al., 2015).

3.4 AGENTES QUÍMICOS DE POTÊNCIA APLICAÇÃO EM ÁGUAS PARA INATIVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

3.4.1 Peróxido de Hidrogênio

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é caracterizado como uma molécula cujas funções biológicas são dependentes de sua concentração. O H_2O_2 possui efeito germicida, uma vez que forma radicais livres que atuam como oxidantes destruindo bactérias e componentes importantes como lipídios, proteínas e o DNA (MATTOS, 2003).

O H_2O_2 é um dos oxidantes mais versáteis, superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio. Através de catálise, o H_2O_2 pode ser convertido em radical hidroxila (OH) obtendo uma reatividade inferior apenas ao flúor. O H_2O_2 é importante na ciência e tecnologia de alimentos, pois está presente em inúmeras reações biológicas como principal produto de várias oxidases (MIYAMOTO, F.; SAEKI, M.; YOSHIZAWA, T.; JPN. J. TOXIC, 1993; GAIKOWSKI, M. P.; RACH, J. J.; RAMSAY, R. T.; AQUACULTURE, 1999 *apud* MATTOS, 2003).

O H_2O_2 é um líquido transparente parecido com a água e com odor característico, estável em temperatura ambiente e não inflamável. É miscível em água em todas as proporções e geralmente vendido como solução aquosa em concentrações entre 20 e 60% (m/v) (SCHUMB, W. C.; SATTERFIELD, C. N.; WENTWORTH, R. L, 1995 *apud* MATTOS, 2003). A decomposição de H_2O_2 libera oxigênio molecular e calor; em soluções diluídas, o calor é facilmente absorvido pela água presente e, em soluções mais concentradas, o calor aumenta a temperatura e acelera a taxa de decomposição do reagente. O peróxido de hidrogênio pode ser empregado como antimicrobiano na forma isolada ou combinada com outros agentes (MATTOS, 2003).

A razão para sua vasta aplicação deve-se ao fato de apresentar seletividade quando tratado sob determinadas condições experimentais, a citar o controle da temperatura, concentração, tempo de reação e adição ou não de catalisadores. Por fim, o H_2O_2 é muito utilizado no tratamento de águas e esgotos há pelo menos 25 anos em países desenvolvidos (MATTOS, 2003).

3.4.2 Dióxido de Cloro

O dióxido de cloro (ClO_2) é um agente químico usado para higienização de materiais que atua na inativação de patógenos devido sua característica mais sutil no contato com a célula bacteriana quando comparado ao gás cloro (Cl_2) (ZHOU et al., 2018a). O dióxido de cloro é um forte oxidante, bactericida, fungicida, algicida e antisséptico, usado também como desinfetante para água de abastecimento público. Pode ser empregado na forma gasosa ou líquida com importâncias toxicológicas diferentes (GÓMEZ-LÓPEZ, 2014), entretanto comparado a sua forma aquosa, o gás ClO_2 tem um efeito antimicrobiano aumentado (ZHOU et al., 2018b).

A célula bacteriana contém em sua parede celular proteína e isso faz com que o ClO_2 seja mais facilmente absorvido pela célula em comparação ao Cl_2 , atuando como uma forma de atrair dióxido de cloro diretamente até a estrutura da célula bacteriana, inativando os microorganismos (ZHOU et al., 2018a). De forma adicional, o dióxido de cloro gera menos subprodutos que a cloração, como os trihalometanos, ácidos haloacéticos, halopicrina, haloacetoneitrilas, halocetonas e cloro hidrato (GÓMEZ-LÓPEZ, 2014).

De acordo com as características do dióxido de cloro, ele é um gás irritante, de coloração amarela para vermelho, com odor desagradável, com massa específica elevada, instável e se

decompõe rapidamente (MERCALF; EDDY, 2011). Ele geralmente é produzido localmente não sendo possível a sua estocagem, sendo também de difícil manipulação (TECNILAB, 2018).

O ClO_2 é altamente oxidante e pode ser produzido por geradores automáticos, bombas dosadoras profissionais, através de duas formas: reação de ácido clorídrico (HCl 9%) e clorito de sódio (NaClO_2 7,5%), com o uso de geradores ácidos; ou por intermédio de geradores a gás, substituindo apenas o HCl pelo gás Cl_2 (EMEC, 2017). Vale ressaltar que não há evidências de imunotoxicidade, toxicidade reprodutiva ou carcinogenicidade pelo dióxido de cloro (GÓMEZ-LÓPEZ, 2014).

Sabe-se que em um abatedouro há sempre uma transmissão de bactérias que está compreendida naturalmente nas víceras e do meio na qual ela está inserida devido ao fluxo, e isso afeta diretamente a própria carcaça bem como todas as outras que entrarem em contato no pré-*chiller*, via contaminação cruzada. Deste modo, a descontaminação pode ser determinada por processos frequentes de higiene durante o processo produtivo (LAWSON et al., 2009), onde além da utilização de processos usuais adotados, como o dióxido de cloro, pode-se aplicar outros meios, como o ultrassom, atuando como um novo método de descontaminação.

A utilização de substâncias químicas tem sido um método para contribuição com a redução microbiana. Na água de *chiller*, segundo o MAPA (BRASIL, 1998), é permitido o uso do nível de cloro livre de até 5 ppm não havendo limite mínimo estabelecido, mas em contrapartida a fixação bacteriana a superfícies irregulares gera a resistência no uso desse desinfetante (MUKHOPADHYAY; RAMASWAMY, 2012).

Contudo, sempre há necessidade de melhores técnicas de inativação que possam ser usadas para atuar no lugar dos sanitizantes ou possivelmente em conjunto. Segundo Mukhopadhyay e Ramaswamy (2012), nos últimos anos novas tecnologias emergentes surgiram com um potencial para inativar *Salmonella* sp. e outros patógenos veiculados juntamente por alimentos. Além disso, tecnologias suaves e baratas e de fácil acesso estão sendo avaliadas, como o ultrassom, infravermelho e luz pulsada, para obter maior aceitação principalmente para atender as necessidades e contribuir no grande desafio da redução microbiana em toda cadeia alimentar (KNORR, 2018).

Segundo Misra, Schlüter e Cullen (2016), não é tão apropriado apenas fazer uma abordagem voltada para a ciência em relação às tecnologias emergentes, no entanto considerar os processos tradicionais já existentes de alimentos e procurar melhorá-los ou combiná-los com os princípios em ascensão seriam mais bem fundamentados (KNORR, 2018). Desta forma, a atuação sinérgica com procedimentos já pré existentes teria maior viabilidade.

Baseado em Huang et al, (2018), a metodologia sugerida no presente trabalho está fundamentada na utilização do ultrassom combinado com compostos químicos. Os autores citados realizaram a aplicação de cloro livre ativo juntamente com a lavagem ultrassônica em um estudo em folhas de alface, visando a redução da contaminação cruzada durante a etapa de lavagem para células de *E. coli* e *L. monocytogenes*.

Voltado para área cárnea, o tratamento do ultrassom em peito de frango foi eficaz no controle do crescimento de bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. segundo estudos de Piñon et al. (2018). Segundo os autores o ultrassom contribuiu para prolongar a vida útil do produto, entretanto, destaca que outros tratamentos alternativos combinados com a cavitação gerada pelo ultrassom deveriam ser investigados para reduzir o número desses patógenos para futura aplicação na indústria cárnea, utilizado como um método de prevenção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO, MEIO DE CULTURA E REAGENTES QUÍMICOS

No desenvolvimento dos experimentos foi utilizada água destilada (1.0 – 0.1 $\mu\text{S}/\text{cm}$) obtida de um destilador de água tipo Pilsen (Quimis, Q341-25, Brasil). A cepa utilizada foi a *Salmonella* entérica entérica sorovar Typhimurium ATCC 14028. Os meios de cultura foram da marca Merck, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi da marca Dinâmica (CAS 7722-84-1) e o dióxido de cloro (ClO_2) foi doado por um abatedouro de aves localizado no oeste do Paraná, em seu estado líquido, obtido através da reação de ácido clorídrico (HCl_2) e clorito de sódio (NaClO_2) por intermédio de geradores ácidos. O ClO_2 foi armazenado em temperatura ambiente, foi levado em conta a pureza do reagente e utilizado em tempo menor que 24 h após sua fabricação.

4.2 REATIVAÇÃO DA CEPA DE *Salmonella* Typhimurium

A cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foi ativada inoculando-se uma alíquota da mesma em 50 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubando-a a 37 °C durante 12 h. A turbidez do caldo após o período de incubação foi utilizada para conferir o crescimento do micro-organismo. Após o período de incubação 10 mL foram reinoculados em 190 mL de caldo BHI. O crescimento do micro-organismo foi monitorado por meio da densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro e da contagem em placas de *Salmonella* Typhimurium nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 9 h (até atingir a fase estacionária). Após realizada a curva de crescimento, estabeleceu-se a fase de maior atividade, com concentração de cepa conhecida para posterior inoculação na água.

A densidade ótica foi determinada em triplicata e a contagem em placas em duplicata e, em ambos os casos os resultados foram expressos como a média \pm desvio-padrão em log UFC mL^{-1} . Os dados experimentais da densidade ótica da *Salmonella* Typhimurium foram ajustados aos modelos primários de Gompertz modificado (MGM) e Logístico (ML). Foram preditos os parâmetros duração da fase *lag* (λ), velocidade específica máxima de crescimento (μ) e aumento logarítmico da população (A). O ajuste dos modelos matemático foi realizado pelos índices estatísticos coeficiente de determinação (R^2), erro médio quadrático (MSE), fator *bias* e fator de exatidão.

O ajuste matemático foi realizado empregando-se o programa *Statistica* 8.0, conforme descrito por Geitenes et al. (2013) e Kalschne et al. (2014).

4.3 EXTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Foram desenvolvidos três planejamentos fatoriais completos. No primeiro experimento, para os testes de inibição da *Salmonella* Typhimurium foram utilizados erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de água destilada. Nos dois experimentos seguintes, por condições operacionais, foram utilizados erlenmeyers de 250 mL contendo 200 mL de água destilada. As amostras de água foram identificadas e submetidas a esterilização em autoclave (121 °C/15 min) (SILVA et al. 2017).

O primeiro planejamento fatorial completo (PFC), foi desenvolvido com duas variáveis independentes (2^2), totalizando 7 ensaios. O segundo e o terceiro PFC posteriormente foram executados com três variáveis independentes (2^3), totalizando 11 ensaios cada, todos efetuados aleatoriamente, com triplicatas no ponto central.

A Tabela 1 apresenta as variáveis reais e codificadas e os níveis estudados no PFC 2^2 com ultrassom isoladamente, a Tabela 2 apresenta as variáveis reais e codificadas do PFC 2^3 com ultrassom e peróxido de hidrogênio e a Tabela 3 também apresenta as variáveis reais e codificadas do PFC 2^3 com ultrassom e dióxido de cloro.

As variáveis independentes estudadas foram x_1 (amplitude de frequência, %), x_2 (tempo, min), x_3 (concentração de peróxido de hidrogênio, %, (v/v) ou a concentração de dióxido de cloro, ppm, (v/v)). 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 ultrassônico (Elmasonic P 120H, Singen, Alemanha).

Inicialmente foi realizado o PFC 2^2 para avaliar o efeito da amplitude de frequência e do tempo de ultrassom sobre a inativação de *Salmonella* Typhimurium. Na sequência foi realizado um PFC 2^3 para avaliar a amplitude de frequência e o tempo de ultrassom combinados com o peróxido de hidrogênio na inativação de *Salmonella* Typhimurium. Por último foi realizado um segundo PFC 2^3 com o intuito de avaliar a amplitude de frequência e o tempo de ultrassom combinados com o dióxido de cloro na inativação de *Salmonella* Typhimurium.

Tabela 1 – Variáveis e Níveis de Variação do PFC 2^2 com Ultrassom Isoladamente.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1

x_1 – Amplitude de frequência (%)	40	70	100
x_2 – Tempo (min) delineamento 2 ²	5	10	15

Fonte: Autoria própria (2018).

Tabela 2 – Variáveis e Níveis de Variação dos PFC 2³ com Ultrassom e Peróxido de Hidrogênio.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
x_1 – Amplitude de frequência (%)	40	70	100
x_2 – Tempo (min)	5	17,2	30
x_3 – Concentração de peróxido de hidrogênio (% , v/v)	1	5	9

Fonte: Autoria própria (2018).

Tabela 3 – Variáveis e Níveis de Variação dos PFC 2³ com Ultrassom e Dióxido de Cloro.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
x_1 – Amplitude de frequência (%)	40	70	100
x_2 – Tempo (min)	5	17,2	30
x_3 – Concentração do dióxido de cloro (ppm, (v/v)	1	74,5	150

Fonte: Autoria própria (2018).

Para os três PFC a variável dependente ou função resposta (\hat{y}) foi expressa como a contagem em placas de *Salmonella* Typhimurium conforme descrita no item 4.4.2.

Para a análise dos efeitos dos PFCs, obtenção dos coeficientes da regressão, Anova do modelo e superfície de resposta, foi utilizado o programa *Statistica* 8.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) empregando-se um nível de significância de 5 % ($p < 0,05$).

Abaixo está apresentado o fluxograma geral para consolidação deste trabalho.

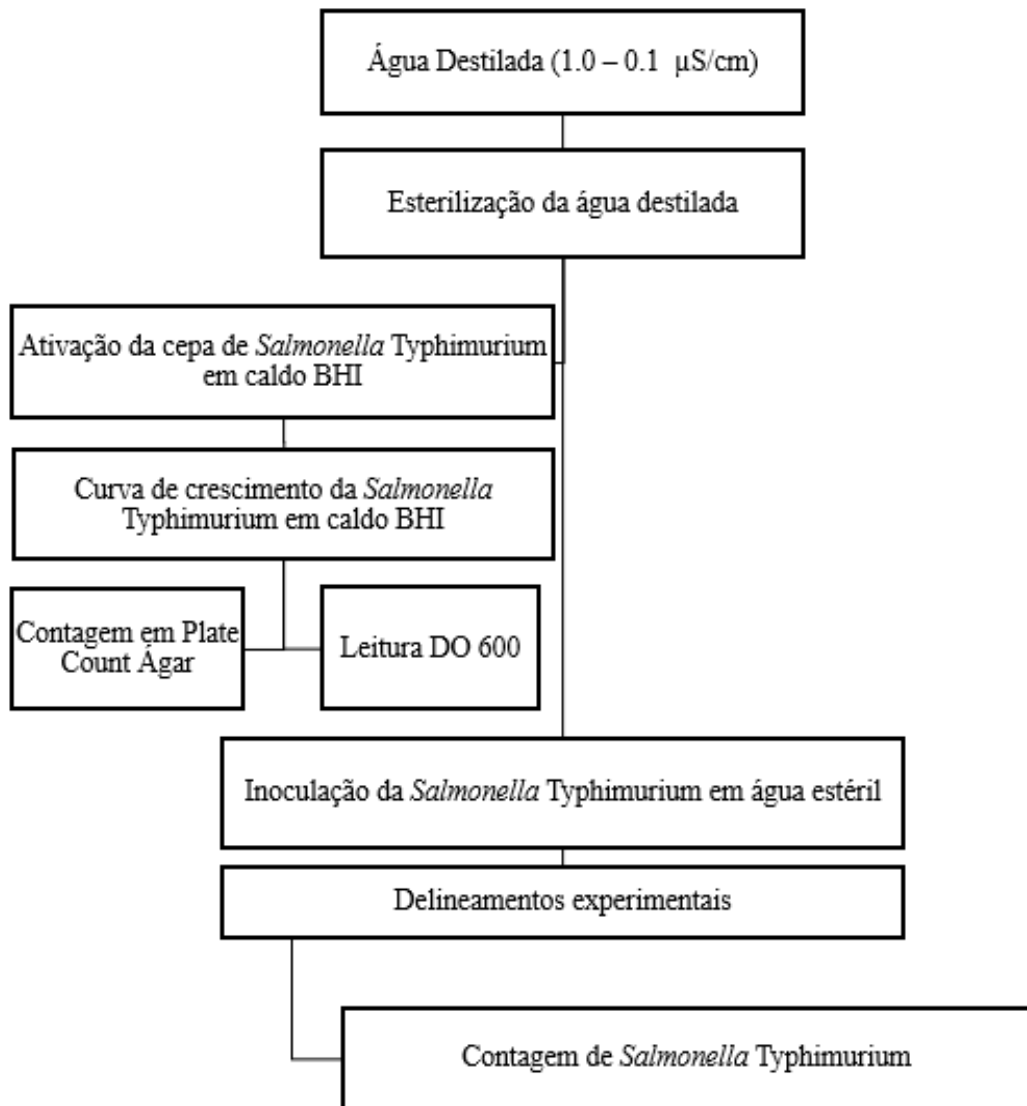


Figura 4 – Fluxograma Geral do Processo de Inativação de *Salmonella Typhimurium* pelo Uso do Ultrassom. Fonte: Autoria própria (2018).

4.3.1 Aplicação do Ultrassom

As amostras de água estéril foram contaminadas com a cepa de *Salmonella* Typhimurium reativada com 1000 μ L (1 mL) e acondicionadas no banho de ultrassom (Elmasonic P 120H, Singen, Alemanha), de modo que fossem sonicadas homoganeamente, seguidas as recomendações de acordo com Nascentes et al. (2001), que estabeleceu condições de otimização para a obtenção de máxima intensidade de cavitação em banhos de ultrassom. Por tanto, 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, conforme ilustrado na Figura 5, de acordo com os planejamentos experimentais descritos no item 4.5. As vidrarias utilizadas foram as mais semelhantes possíveis.

Durante a aplicação do ultrassom, a temperatura da água foi mantida em 30 °C com adição de gelo/água gelada, quando necessário. A amplitude de frequência foi fixada em 37 kHz, a qual juntamente com as variáveis independentes e os níveis de variação, foram selecionados com base na literatura de José e Vanetti (2012), Rosário et al. (2017) e Piñon et al. (2018) (Tabela 1).

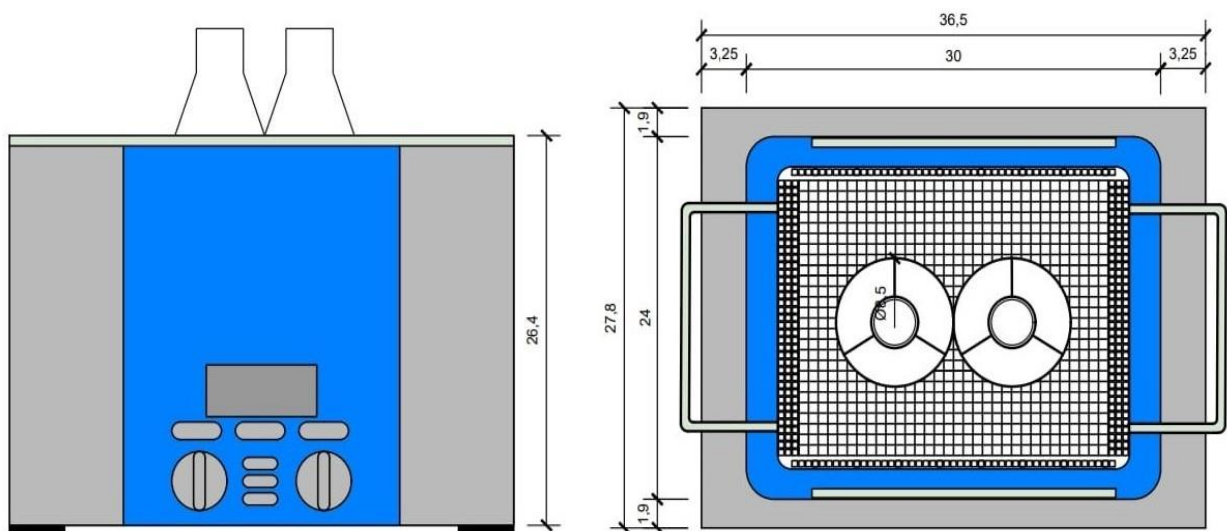


Figura 5 – Layout do Ultrassom com as Medidas e Localizações Reais Utilizados dos Erlenmeyer Acondicionados dentro do Banho Ultrassônico.

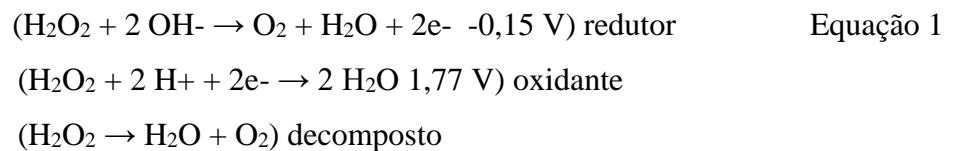
Fonte: Autoria própria (2018).

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Método Titulométrico Para Determinação de H₂O₂ em Água

Para verificar se o teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi reduzido com a aplicação do ultrassom empregou-se a análise por volumetria de óxido-redução, para determinar por permanganometria a concentração exata de H₂O₂ segundo a metodologia de Santiago et al (2016) (Equação 1).

Depois da padronização do permanganato de potássio (KMnO₄), por titulometria, foram utilizados dois testes, ambos contendo 200 mL de água destilada e 9 ppm de H₂O₂ sem inóculo. Sendo a amostra padrão (A₁) não sonicada e amostra teste (T2) sonicada. As condições de aplicação do ultrassom foram as mesmas utilizados no ensaio 8 do PFC 2³, com 100% de potência, tempo de 30 min e 9 ppm de H₂O₂ (Tabela 6).



4.4.2 Contagem de *Salmonella* Typhimurium

Alíquotas de 1 mL dos ensaios dos PFC e da curva de crescimento foram utilizados para efetuar a diluição 10⁻¹ e as diluições seriadas subsequentes que foram plaqueadas em profundidade em ágar *Plate Count Agar* (PCA) adicionado de 0,015% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). As placas de Petri foram incubadas invertidas na temperatura de 37 ± 1 °C por 12 ± 2 h conforme Beloti et al. (1999). As contagens foram realizadas em duplicata e expressas pela média ± desvio padrão em log de UFC mL⁻¹.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CURVA DE CRESCIMENTO da *Salmonella* Typhimurium

Na Tabela 4 é possível observar os resultados obtidos para os parâmetros λ , μ e A . O valor de λ foi de 0,73 para o MGM e de 0,66 para o ML. A duração da fase *lag* de um micro-organismo é influenciada pelo inóculo aplicado, logo quanto maior o número de células inoculadas inicialmente, menor será fase *lag* (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000). Os resultados da λ de *Salmonella* Typhimurium para o MGM foram menores que o reportado por Erkmen e Barazi (2007), de 1,38 h, indicando que no presente trabalho a multiplicação das células ocorreu mais rapidamente. Os autores citados utilizaram um inóculo de 10% (v/v) enquanto no presente trabalho o inóculo representou 5% (v/v), entretanto a temperatura de incubação utilizada pelos autores foi de 12 °C, comparada a 37 °C, justificando as divergências obtidas para esse parâmetro.

Tabela 4 – Parâmetros de Crescimento Preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico.

Micro-organismo	Modelos primários		
	Índices	MGM	ML
<i>Salmonella</i> Typhimurium	λ (h)	0,73	0,66
	μ (h ⁻¹)	1,52	1,19
	A (log Do/Do _{zero})	0,95	0,95

Fonte: Autoria própria (2018).

A velocidade específica máxima de crescimento (μ) foi de 1,52 h⁻¹ para o MGM e de 1,19 h⁻¹ para o ML. Erkmen e Barazi (2007) reportaram valores de μ para a *Salmonella* Typhimurium de 0,62 e 0,49 h⁻¹ para o MGM e ML, respectivamente. Os dados dos autores citados indicam uma multiplicação mais lenta em comparação aos dados do presente trabalho, justificada pela temperatura de incubação inferior (12 °C). E por fim, o aumento logarítmico da população (A) para este micro-organismo foi de 0,95 Do.

Na Tabela 5 são apresentados os índices estatísticos utilizados na avaliação do ajuste dos modelos. Observa-se que ambos os modelos matemáticos tiveram bom ajuste, indicando que os dois podem ser utilizados para prever o crescimento da *Salmonella* Typhimurium. O R² foi de 0,973, o MSE 0,009, o Fator de *Bias* 0,995 e o Fator de exatidão de 1,103 para o MGM e ML. Para o R², o valor obtido é próximo a 1, representando um bom ajuste. O MSE,

por indicar um erro, quanto mais próximo de zero melhor, logo esse índice (0,009) também teve um ótimo ajuste. Um Fator *bias* igual 1 indica que os dados preditos foram iguais aos observados, logo valores inferiores, como 0,995, representam dados observados ligeiramente inferiores aos preditos. O Fator de Exatidão é sempre maior que 1, logo a qualidade do ajuste diminui conforme o aumento desse índice estatístico. O Fator de Exatidão de 1,103 representa um bom ajuste.

Tabela 5 – Parâmetros de Crescimento Preditos pelo Modelo de Gompertz Modificado e Modelo Logístico.

Micro-organismo	Modelos primários		
	Índices	MGM	ML
<i>Salmonella</i>	R ²	0,973	0,973
Typhimurium	MSE	0,009	0,009
	Fator <i>bias</i>	0,995	0,995
	Fator Exatidão	1,103	1,103

Fonte: Autoria própria (2018).

Nas Figuras 6.a (MGM) e 6.b (ML) são demonstradas as curvas de crescimento preditas pelos modelos, os dados experimentais da densidade ótica e as contagens em placas observadas para a *Salmonella* Typhimurium.

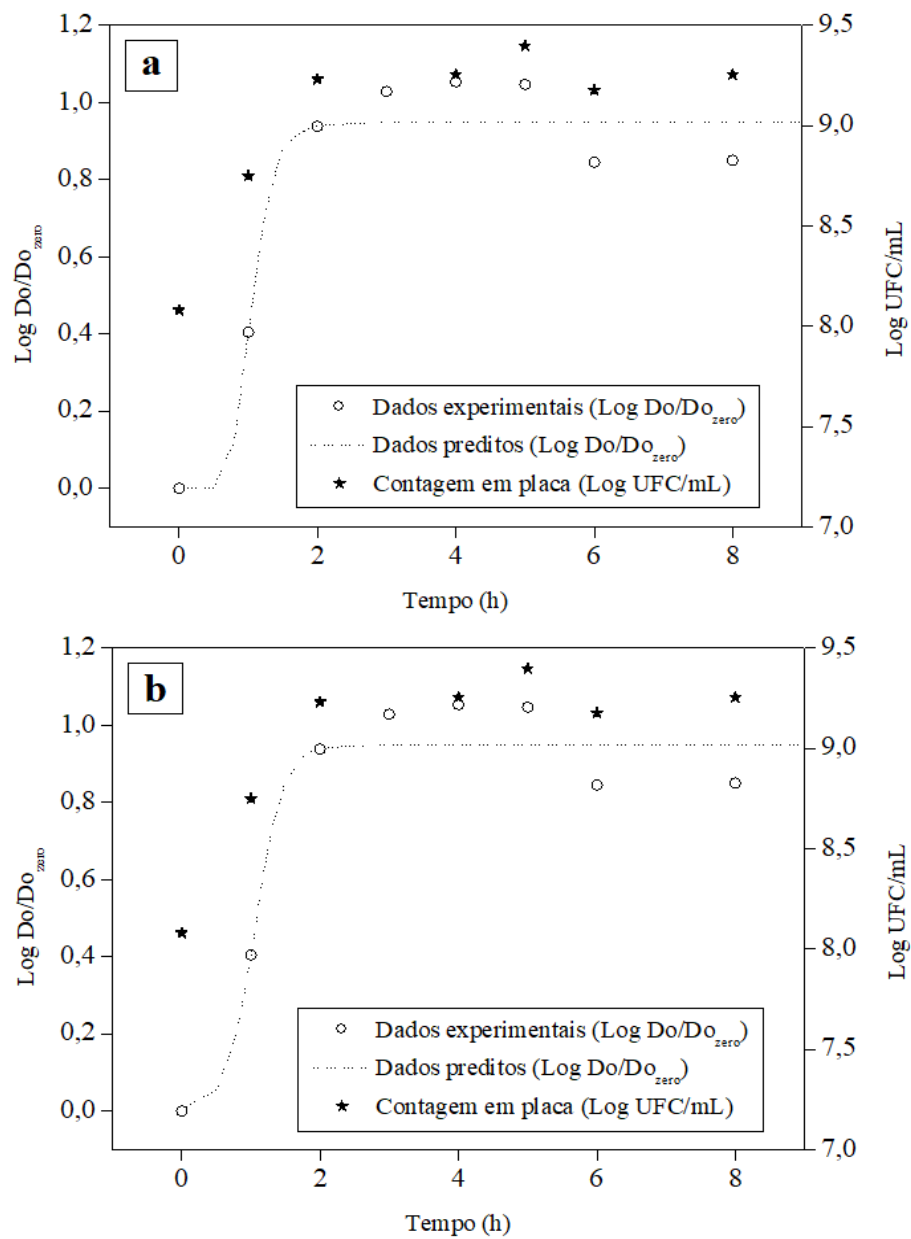


Figura 6. (a) Curva de Crescimento da *Salmonella Typhimurium* Preditada pelo Modelo de Gompertz Modificado; (b) Curva de Crescimento da *Salmonella Typhimurium* Preditada pelo Modelo Logístico.

Fonte: Autoria própria (2018).

5.2 PFC 2² PARA AVALIAÇÃO DO ULTRASSOM ISOLADAMENTE NA INIBIÇÃO DA *Salmonella Typhimurium*

Os resultados obtidos no PFC 2² com três pontos centrais estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Matriz dos Ensaios do PFC 2² com as Variáveis Independentes Reais e Codificadas e Resposta para Inibição da *Salmonella* Typhimurium.

Ensaios	Variáveis		
	Amplitude de frequência (%)	Tempo (min)	<i>Salmonella</i> Typhimurium (log UFC mL ⁻¹)
	x_1	x_2	y_1
1	-1 (40)	-1 (5)	7,35 ± 0,05
2	1 (100)	-1 (5)	7,32 ± 0,03
3	-1 (40)	1 (15)	7,31 ± 0,03
4	1 (100)	1 (15)	7,34 ± 0,04
5	0 (70)	0 (10)	7,31 ± 0,01
6	0 (70)	0 (10)	6,81 ± 0,72
7	0 (70)	0 (10)	7,28 ± 0,02

Fonte: Autoria própria (2018).

Não foram observados efeitos significativos para as variáveis tanto a amplitude de frequência como o tempo no ultrassom nas faixas estudadas ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Estimativa dos Efeitos do PFC 2² Empregando o Ultrassom Isoladamente.

Variável	Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	7,32	0,01	677,07	0,000*
Amplitude de frequência(x_1)	0,00	0,03	0,02	0,987
Tempo (x_2)	-0,02	0,03	-0,72	0,521
x_1 por x_2	0,02	0,03	0,72	0,521

* $p < 0,05$.

Fonte: Autoria própria (2018).

No intervalo das faixas estudadas para a amplitude de frequência e tempo de aplicação, as respostas obtidas para contagem de *Salmonella* Typhimurium em água apresentaram-se muito próximas e sem efeitos na inativação. Isso foi relatado em revisão da literatura por Lawson et al. (2009), que pelo uso do US isoladamente não obteve efeitos significativos.

5.3 PFC 2³ PARA AVALIAÇÃO ULTRASSOM COMBINADO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA INIBIÇÃO DA *Salmonella* Typhimurium

Este planejamento foi realizado a partir dos resultados obtidos do PFC 2² (item 5.2). Sendo assim, optou-se por acrescentar uma terceira variável independente, o H₂O₂ em diferentes concentrações, embasado nos autores José e Vanetti (2012) que utilizaram 5% de peróxido combinado com ultrassom. O tempo de sonicação também foi aumentado com base nos estudos realizados por Piñon et al. (2018), que utilizaram 50 min de sonicação em banho

de ultrassom (40 kHz, 9,6 W cm⁻²) na inibição de *Salmonella* spp. em carne de peito de frango. Contudo foi considerado que a superfície em peitos de frango apresenta maior rusticidade e quando comparados com à água, obviamente, esse tempo poderia ser reduzido estabelecendo as condições de aplicação deste delineamento e dos ensaios posteriores com 30 min de sonicação.

Os resultados obtidos para o PFC 2³ combinando o uso do ultrassom com o peróxido de hidrogênio estão descritos nas Tabela 8.

Tabela 8 – Matriz dos Ensaios do PFC 2³ com as Variáveis Independentes Reais e Combinando Ultrassom e Peróxido de Hidrogênio e Resposta para Inibição da *Salmonella* Typhimurium.

Ensaios	Variáveis			
	Amplitude de frequência (%)	Tempo (min)	Concentração H ₂ O ₂ (ppm)	<i>Salmonella</i> Typhimurium (log UFC mL ⁻¹)
	x_1	x_2	x_3	y_1
1	-1 (40)	-1 (5)	-1 (1)	7,28 ± 0,01
2	1 (100)	-1 (5)	-1 (1)	7,10 ± 0,03
3	-1 (40)	1 (30)	-1 (1)	7,24 ± 0,05
4	1 (100)	1(30)	-1 (1)	7,15 ± 0,01
5	-1 (40)	-1 (5)	1 (9)	7,12 ± 0,00
6	1 (100)	-1 (5)	1 (9)	6,57 ± 0,09
7	-1 (40)	1 (30)	1 (9)	7,00 ± 0,02
8	1(100)	1 (30)	1 (9)	6,69 ± 0,07
9	0 (70)	0 (17,2)	0 (5)	7,15 ± 0,03
10	0 (70)	0 (17,2)	0 (5)	7,13 ± 0,02
11	0 (70)	0 (17,2)	0 (5)	7,05 ± 0,01

Fonte: Autoria própria (2018).

Na Tabela 9 são mostrados os efeitos para o PFC 2³ combinando ultrassom com peróxido de hidrogênio. As variáveis amplitude de frequência e concentração de peróxido de hidrogênio tiveram efeitos negativos no crescimento de *Salmonella* Typhimurium ($p < 0,05$), indicando-se que ao passar do nível -1 para +1 houve uma maior redução na contagem em placas do patógeno.

Tabela 9 – Estimativa dos Efeitos do PFC 2³ Empregando o Ultrassom Combinado com Peróxido de Hidrogênio.

Variável	Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	7,04	0,02	283,60	0,000*
Amplitude de frequência(x_1)	-0,28	0,06	-4,85	0,008*
Tempo (x_2)	0,00	0,06	0,08	0,937
Peróxido (x_3)	-0,35	0,06	-5,95	0,004*
x_1 por x_2	0,08	0,06	1,42	0,228

x ₁ por x ₃	-0,15	0,06	-2,50	0,067
x ₂ por x ₃	-0,00	0,06	-0,04	0,970

*p < 0,05.

Fonte: Autoria própria (2018).

Os efeitos não significativos ($p > 0,05$) foram incorporados ao resíduo do modelo, de forma a obter um valor de R-ajustado maior. Na Tabela 10 é mostrada a Anova do modelo, com R^2 de 0,91 e R-ajustado de 0,88. Verifica-se que a regressão foi significativa, com um $F_{\text{calculado}}$ de 25,22 e um F_{tabelado} de 4,35 ($p = 0,0004$).

Tabela 10 – Anova do Modelo do PFC 2³ Empregando o Ultrassom Combinado com Peróxido de Hidrogênio.

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	$F_{\text{calculado}}$	F_{tabelado}	p-valor
Regressão	0,442	3	0,147	25,22	4,35	0,0004*
Resíduos	0,041	7	0,006			
Total	0,483	10	0,048			

*p < 0,05.

Na Equação 2 é mostrado o modelo e na Figura 7 a superfície de resposta e a curva de contorno da inibição de *Salmonella Typhimurium* empregado a combinação do ultrassom com o H₂O₂.

$$y = 7,04 - 0,14x_1 - 0,17x_3 - 0,07x_1x_3$$

Equação 2

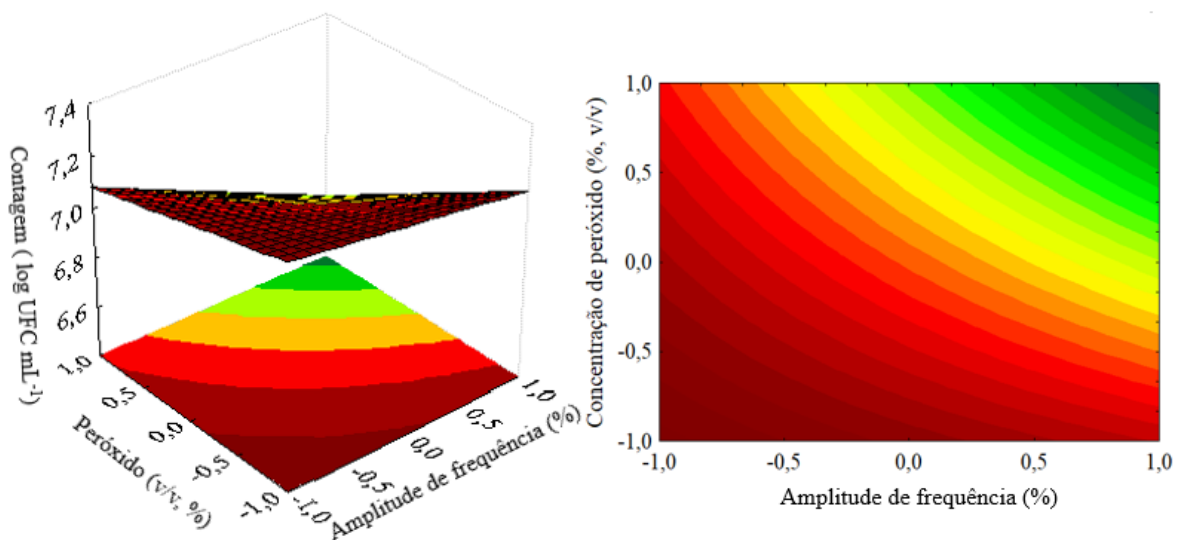


Figura 7 – Superfície de Resposta e Curva de Contorno PFC 2³ Empregando o Ultrassom Combinado com Peróxido de Hidrogênio.

Fonte: Autoria própria (2018).

A literatura informa que o H_2O_2 é considerado um bom agente bactericida, capaz de inviabilizar as células microbianas em atividade, motivo pelo qual é utilizado na descontaminação de águas (COOPER et al., 1988; ARAÚJO et al., 2016).

Observando as respostas dos ensaios do PFC 2³, os resultados de inibição de *Salmonella* Typhimurium, apesar de mostrarem efeitos significativos, quase não reduziram as contagens finais. Os resultados não apresentaram alta eficácia, e matérias-primas ou água com contagens altas ainda continuaram tendo células de *Salmonella* Typhimurium. Resultados semelhantes foram relatados por Weissinger e Beuchat (2000) e Hong; Park; Kang (2018), nos quais sementes de alfafa inoculadas com *Salmonella* Typhimurium dispostas em soluções contendo 2% de H_2O_2 durante 10 min tiveram uma redução de 0,67 e 1,51 log UFC g⁻¹, respectivamente.

Esperava-se uma maior redução na contagem de *Salmonella* Typhimurium com a utilização de H_2O_2 combinado com US, por isso foi realizada a análise de decomposição do H_2O_2 . O item 5.3.1 traz uma discussão sobre o efeito desta variável e possíveis explicações do que pode ter ocorrido neste planejamento.

5.3.1 Decomposição de Peróxido de Hidrogênio

Na análise da decomposição do peróxido de hidrogênio por titulometria foram obtidos os resultados ilustrados na Figura 8.

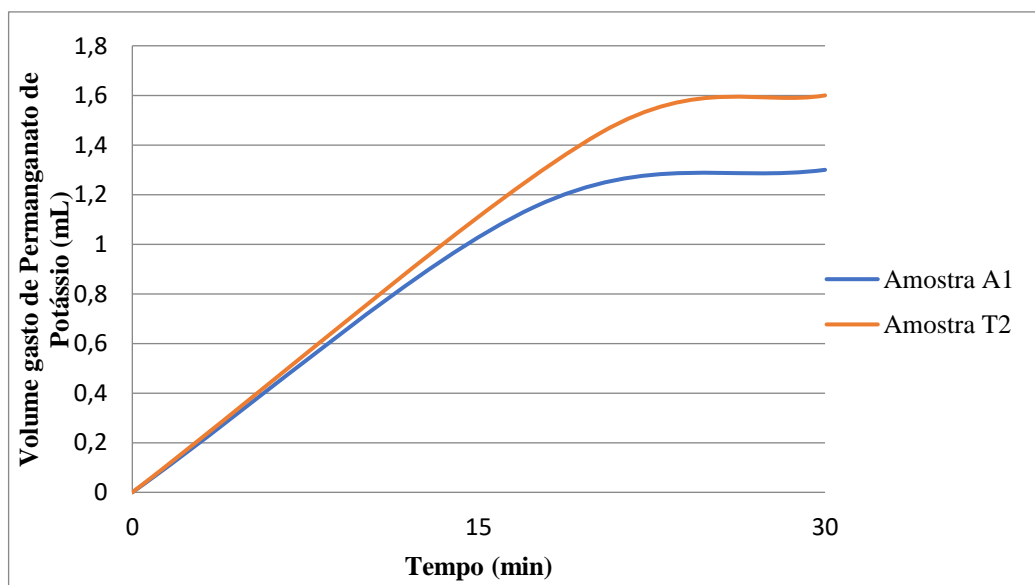


Figura 8 – Concentração de Permanganato de Potássio Usado para Amostra com Sonicação no Ultrassom e Outra na Ausência do Tratamento.

Fonte: Autoria própria (2018).

Quando comparadas as amostras A₁ (controle não sonicado) e T₂ (sonicado), percebe-se que houve diferença no volume gasto na titulometria com KM_nO₄. O princípio da titulometria é neutralizar um reagente, logo na neutralização do H₂O₂ presente nas amostras foi preciso 1,3 mL de KM_nO₄ para A₁ e 1,6 mL para T₂, equivalente a uma variação de quase 20% no volume gasto. Isso mostra que no ultrassom ocorreu uma perda gradativa de peróxido. Induz-se que, se fosse monitorada a amostra T₂ durante tempos no ultrassom superiores aos 30 min (+1) (ensaio 8, Tabela 8), poderia ser gasto um volume maior na titulometria. Logo, o H₂O₂ torna-se instável e decompõe-se à medida que o tempo passa quando submetido ao ultrassom. Mais testes precisariam ser feitos para comprovar o efeito do ultrassom na decomposição do peróxido de hidrogênio, entretanto quando comparado com a amostra A₁ é possível concluir que o H₂O₂ se decompõe no ultrassom.

Uma vez que a aplicação do H₂O₂ tinha a finalidade de intensificar o efeito na redução de *Salmonella* Typhimurium juntamente com a amplitude de frequência e o tempo de ultrassom, verifica-se que o peróxido de hidrogênio não foi um agente bactericida eficaz combinado com o ultrassom. Segundo Mattos (2003), o peróxido de hidrogênio é o terceiro maior agente oxidante empregado, ficando atrás do flúor e ozônio. Portanto, apesar do H₂O₂ conter características interessantes para redução de *Salmonella* Typhimurium, ele combinado com o ultrassom de alta amplitude de frequência não se mostrou efetivo. A sua substituição por outro agente químico, que não se decomponha no ultrassom seria mais viável.

5.4 PFC 2³ PARA AVALIAÇÃO DO ULTRASSOM COMINADO COM DIÓXIDO DE CLORO NA INIBIÇÃO DA *Salmonella* Typhimurium

Rodrigues e Iemma (2014) descrevem que embora as variáveis estudadas não sejam estatisticamente significativas é a partir desses resultados que o estudo se torna muito interessante, considerando possível a substituição dos componentes.

Por isso, a mudança de agente químico H₂O₂ por dióxido de cloro (ClO₂), foi uma alternativa para verificar experimentalmente as condições e a ação desse outro sanitizante. O intervalo de tempo foi mantido equivalente ao item 5.3 segundo as adaptações do estudo de Piñon et al. (2018), justamente para comparar os agentes químicos. A faixa de trabalho da amplitude de frequência também permaneceu inalterada.

Os resultados obtidos para o PFC 2³ combinando o uso do ultrassom com o dióxido de cloro estão descritos nas Tabela 11. Para os ensaios de 5 a 11 a contagem foi <10¹ UFC mL⁻¹ nas duplicatas, sendo considerada igual a 0 log UFC mL⁻¹. No entanto, na Tabela 11 foi

considerado como valor de 0 para variável resposta, para fins de tratamento dos dados estatísticos.

Tabela 11 – Matriz dos Ensaios do PFC 2³ com as Variáveis Independentes Reais e Codificadas Combinando Ultrassom e Dióxido de Cloro e Resposta para Inibição da *Salmonella Typhimurium*.

Ensaios	Variáveis			
	Amplitude de frequência (%)	Tempo (min)	Concentração Cl ₂ O (ppm)	<i>Salmonella Typhimurium</i> (log UFC mL ⁻¹)
	x_1	x_2	x_3	y_1
1	-1 (40)	-1 (5)	-1 (1)	6,75 ± 0,05
2	1 (100)	-1 (5)	-1 (1)	7,27 ± 0,03
3	-1 (40)	1 (30)	-1 (1)	7,17 ± 0,02
4	1 (100)	1(30)	-1 (1)	7,17 ± 0,01
5	-1 (40)	-1 (5)	1 (150)	0
6	1 (100)	-1 (5)	1 (150)	0
7	-1 (40)	1 (30)	1 (150)	0
8	1(100)	1 (30)	1 (150)	0
9	0 (70)	0 (17,2)	0 (74,5)	0
10	0 (70)	0 (17,2)	0 (74,5)	0
11	0 (70)	0 (17,2)	0 (74,5)	0

Fonte: Autoria própria (2018).

Na Tabela 12 são mostrados os efeitos para o PFC 2³ combinando ultrassom com dióxido de cloro. Somente a variável concentração de dióxido de cloro teve efeito negativo na quantificação de *Salmonella Typhimurium* ($p < 0,05$), indicando-se que ao passar do nível -1 para +1 houve a inibição na contagem em placas da *Salmonella Typhimurium*.

O uso de dióxido de cloro na concentração aplicada no ponto central (0), de 74,5 ppm, ou em concentrações maiores como no nível +1, de 150 ppm, foi responsável pela total inibição de *Salmonella Typhimurium* na água. Em contrapartida, a amplitude de frequência e o tempo no US não mostraram efeitos significativos na redução do micro-organismo estudado ($p > 0,05$).

Tabela 12 – Estimativa dos Efeitos do PFC 2³ Empregando o Ultrassom Combinado com Dióxido de Cloro.

Variável	Efeito	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	2,58	0,79	3,26	0,031*
Amplitude de frequência(x_1)	0,13	1,85	0,07	0,947
Tempo (x_2)	0,08	1,85	0,04	0,968
Dióxido (x_3)	-7,09	1,85	-3,83	0,019*
x_1 por x_2	-0,13	1,85	-0,07	0,947
x_1 por x_3	-0,13	1,85	-0,07	0,947
x_2 por x_3	-0,08	1,85	-0,04	0,968

*p < 0,05.

Fonte: Autoria própria (2018).

Os efeitos não significativos foram incorporados ao resíduo do modelo, de forma a obter um valor de R-ajustado maior mantendo o valor de R² inicialmente obtido. Na Tabela 13 é mostrada a Anova do modelo, que obteve um R² de 0,78 e um R-ajustado de 0,76. Verifica-se que a regressão foi significativa, com um F_{calculado} de 32,80 e um F_{tabelado} de 5,12 (p = 0,0003).

Tabela 13 – Anova do Modelo do PFC 2³ Empregando o Ultrassom Combinado com Dióxido de Cloro.

	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}	p-valor
Regressão	100,57	1	100,57	32,81	5,12	0,0003*
Resíduos	27,59	9	3,07			
Total	128,16	10	12,82			

*p < 0,05.

Fonte: Autoria própria (2018).

Sendo assim, na Equação 3 é mostrado o modelo, e na Figura 9 a superfície de resposta e a curva de contorno da inibição de *Salmonella* Typhimurium empregando a combinação do ultrassom com o dióxido de cloro.

$$y = 2,58 - 3,55 x_3$$

Equação 3

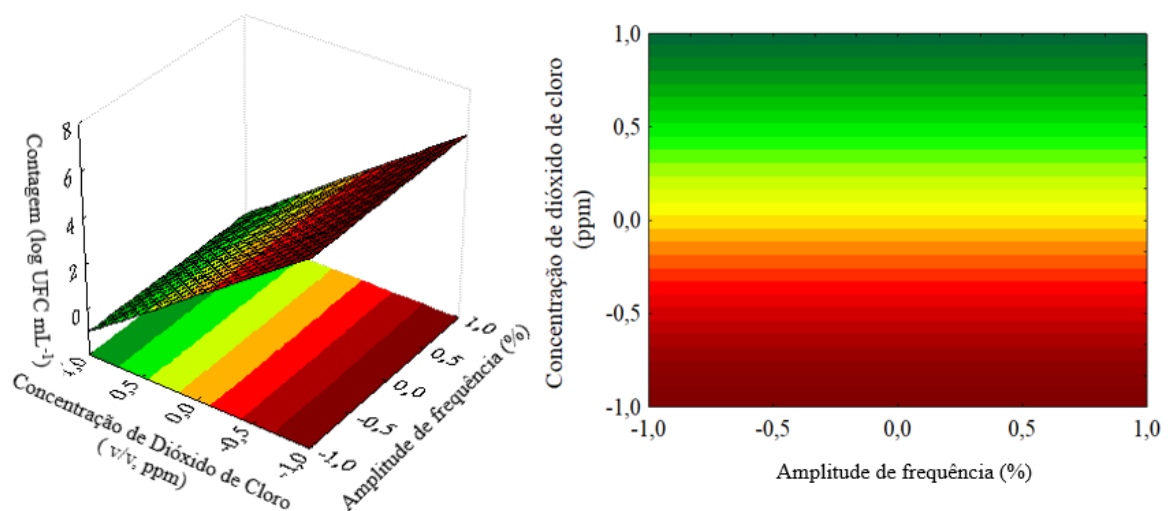


Figura 9 – Superfície de Resposta e Curva de Contorno PFC 2³ Empregado o Ultrassom Combinado com Dióxido de Cloro.

Fonte: Autoria própria (2018).

O ClO₂ mostrou um forte poder bactericida, eficiente em concentrações de 74,5 ppm ou mais sem a necessidade da aplicação de ultrassom. Portanto, nestas condições a água apresenta-se com ausência de contaminação microbiológica, em termos de *Salmonella* Typhimurium, segundo as considerações do Ministério da Saúde (2011). Segundo o órgão citado, a dose infectante de *Salmonella* sp. em indivíduos normais e imunocomprometidos é de 10⁶ a 10⁸ células e ≤ 10³, respectivamente.

6 CONCLUSÕES

No tratamento com ultrassom isoladamente as variáveis do PFC 2² amplitude de frequência e tempo, na faixa estudada, não tiveram efeitos significativos ($p > 0,05$) na redução da *Salmonella* Typhimurium na água. Quando estudado o ultrassom combinado com o peróxido de hidrogênio empregando um PFC 2³ as variáveis amplitude de frequência e concentração de peróxido tiveram efeitos negativos significativos ($p < 0,05$) na contagem de *Salmonella* Typhimurium. Entretanto a redução em ciclos log na melhor condição foi só de 3,01 log UFC mL⁻¹, não sendo suficiente para eliminar o patógeno. A combinação do ultrassom com o dióxido de cloro, em um PFC 2³, mostrou que somente a variável concentração de dióxido de cloro teve efeito negativo e significativo ($p < 0,05$) na contagem de *Salmonella* Typhimurium. Por isso, apesar do US ser uma tecnologia nova com grande potencial para a inibição da *Salmonella* Typhimurium outros estudos devem ser conduzidos com o objetivo de avaliar diferentes variáveis e níveis. Por sua vez, o dióxido de cloro na concentração mínima de 74,5 ppm aplicado isoladamente foi a melhor condição para a inativação total do micro-organismo estudado.

SUGESTÕES TRABALHOS FUTUROS

- Verificar se a aplicação de ultrassom por sonda teria efeito na redução da *Salmonella* Typhimurium nas mesmas condições de amplitude de frequência e tempo utilizados no banho de US.
- Estabelecer condições de uso otimizadas para amplitude de frequência e tempo na sonda de US na redução de *Salmonella* Typhimurium, ou ainda combiná-la com diferentes sanitizantes.
- Verificar as concentrações mínimas de H₂O₂ necessárias para a inibição total de *Salmonella* Typhimurium.
- Estabelecer a concentração mínima de ClO₂ isolado para inibição total de *Salmonella* Typhimurium.
- Analisar as condições de inibição de *Salmonella* Typhimurium na água do *chiller* sob condições naturais de ocorrência e com a presença de interferentes como a matéria orgânica em suspensão.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: Informação e documentação — Trabalhos acadêmicos — Apresentação. Rio de Janeiro, p. 1-9. 2011.
- ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. 2017. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/noticia/projecoes-e-perspectivas-da-avicultura-e-da-suinocultura-2285>>. Acesso em: 22 maio. 2018.
- ADAY, Mehmet Seckin; CANER, Cengiz. Individual and combined effects of ultrasound, ozone and chlorine dioxide on strawberry storage life. **Food Science and Technology**, v. 57, n. 1, p.344-351, jun. 2014.
- ALARCON-ROJO, A.d. et al. Power ultrasound in meat processing. **Meat Science**, v. 107, p.86-93, 2015.
- ANDREUCCI, Ricardo. Aplicação Industrial Ensaio por Ultrassom. **Assessoria e Serviços Técnicos Ltda Copyright**, p. 4-11, jul. 2003.
- ARAÚJO, Karla Santos de et al. Advanced oxidation processes: a review regarding the fundamentals and applications in wastewater treatment and industrial wastewater. **Ambiente e água - An interdisciplinary journal of applied science**, v. 11, n. 2, p.387-401, 15 abr. 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS (ABNT). **NBR 14724**: informações e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2011.
- ASHOKKUMAR, M.; KENTISH, S. The physical and chemical effects of ultrasound. **In: Ultrasound technologies for food and bioprocessing**. Feng, H.; Barbosa-Cánovas, G. V.; Weiss, J. editores, 2011.
- BARTENFELD, L. N. et al. The effect of high-level chlorine carcass drench on the recovery of *Salmonella* and enumeration of bacteria from broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 93, n. 11, p.2893-2899, 1 nov. 2014.
- BELOTI, V. et al. Frequency Of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) Non-Reducing Bacteria in Pasteurized Milk. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, SP, Brasil, p.137-140, jun. 1999.
- BIAZUZ, Taís et al. Modelagem Do Crescimento De Espécies De *Lactobacillus* Probióticos. **II Mostra Científica de Alimentos**. 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Divisão de Produtos de Origem Animal. **Portaria n.210 de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves**. Brasília: M.A.A., 1998.

CARRASCO, Elena; MORALES-RUEDA, Andrés; GARCÍA-GIMENO, Rosa María. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p.545-556, mar. 2012.

CEPEA. **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada**. 2018. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/releases/frango-perspec-2018-com-excedente-setor-dependera-de-bom-desempenho-das-exportacoes.aspx>>. Acesso em: 22 maio. 2018.

CHANG, Hai-jun et al. Effects of Characteristics Changes of Collagen on Meat Physicochemical Properties of Beef Semitendinosus Muscle during Ultrasonic Processing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 1, p.285-297, 3 out. 2012.

CICHOSKI, Alexandre José et al. Ultrasound-assisted post-packaging pasteurization of sausages. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 30, p.132-137, 2015.

CINTRA, A.p.r. et al. Influence of cutting room temperature on the microbiological quality of chicken breast meat. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 3, p.814-820, jun. 2016.

COOPER, William J. et al. **Photochemical formation of hydrogen peroxide in natural waters exposed to sunlight**. Environmental Science & Technology, v. 22, n. 10, p.1156-1160, out. 1988.

DEPNER, R. F. R. Comparação dos resultados da contaminação por mesófilos e enterobactérias e dos aspectos operacionais entre os métodos de refil e lavagem de carcaças em abatedouros de frangos do rio grande do sul. 2015. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria do Rio Grande do Sul – RS. 2015.

DUAN, Debao et al. Application of disinfectant sprays after chilling to reduce the initial microbial load and extend the shelf-life of chilled chicken carcasses. **Food Control**, v. 75, p.70-77, maio 2017.

DUARTE, Ana Lúcia Almeida et al. Ultrasound improves antimicrobial effect of sodium dichloroisocyanurate to reduce *Salmonella* Typhimurium on purple cabbage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 269, p.12-18, mar. 2018.

EMEC, s.r.l. Gerador de dióxido de cloro. **Chemical dosing and control equipments**. Italia, 2017. Disponível em: <<http://www.emecpumps.com/pt/produtos/sistemas-de-desinfeccao/296-lotus-easy>>. Acesso em: 24 maio. 2018.

ERKMEN, Osman; BARAZI, Aykut. Modelling the effects of modified atmosphere on *Salmonella* Typhimurium in packaged meat during storage in the refrigerator and at 12 °C. **Annals of Microbiology** 58 (1), p. 73-81, 2007.

FLORES, Diego Rafael Martins et al. Application of ultrasound in chicken breast during chilling by immersion promotes a fast and uniform cooling. **Food Research International**, v. 109, p.59-64, jul. 2018.

Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas (FACTA). **Abate de Processamento de Frangos**. Campinas, 1994.

GEITENES, Simone et al. Growth Modeling of Lactic Acid Bacteria and Microbiological Analysis in Two Types of Sliced Vacuum Package Cooked Ham. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, n. 1, p.113-133, 26 nov. 2013.

GÓMEZ-LÓPEZ, V.m. Chlorine Dioxide. **Encyclopedia of Toxicology**, p.864-866, 2014.

HARB, Ali et al. Occurrence, antimicrobial resistance and whole-genome sequencing analysis of *Salmonella* isolates from chicken carcasses imported into Iraq from four different countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p.84-90, nov. 2018.

HONG, Eun-jeong; PARK, Sang-hyun; KANG, Dong-hyun. Sequential treatment of hydrogen peroxide, vacuum packaging, and dry heat for inactivating *Salmonella* Typhimurium on alfalfa seeds without detrimental effect on seeds viability. **Food Microbiology**, v. 77, n. 1, p.130-136, fev. 2019.

HUANG, Kang et al. Efficacy of decontamination and a reduced risk of cross-contamination during ultrasound-assisted washing of fresh produce. **Journal of Food Engineering**, v. 224, p.95-104, maio 2018.

ICMSF. Microorganismos indicadores. In. **Microorganismos de los Alimentos**. Huesca, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **A Estabilidade do Ácido Peracético**. p.10-12, 2014.

JOSÉ, Jackline Freitas Brilhante São; VANETTI, Maria Cristina Dantas. Effect of ultrasound and commercial sanitizers in removing natural contaminants and *Salmonella* enterica Typhimurium on cherry tomatoes. **Food Control**, v. 24, n. 1-2, p.95-99, mar. 2012.

KALSCHNE, Daneysa L. et al. Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: A model approach. **Meat Science**, v. 98, n. 4, p.744-752, dez. 2014.

KIM, S. A., et al. Assessment of chicken carcass microbiome responses during processing in the presence of commercial antimicrobials using a next generation sequencing approach. **Scientific Reports**. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep43354>>. Acesso em: 12 março. 2018.

KNORR, Dietrich. Emerging technologies: Back to the future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 76, p.119-123, jun. 2018.

LAWSON, Lartey G. et al. Cost-effectiveness of *Salmonella* reduction in Danish abattoirs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p.126-132, 31 ago. 2009.

LOPES, Melissa et, al. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 3, p. 465-476, jul./set. 2007.

LUO, Yunchun et al. Characteristic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* from gastroenteritis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n. 4, p.251-255, abr. 2018.

MAJOWICZ, Shannon e. et al. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, **Oxford University Press**, v. 50, n. 6, p.882-889, 15 mar. 2010.

MASON, T.J. Sonochemistry - Beyond Synthesis. **E-Magazine**. Royal Society of Chemistry, V.46, n.05, 2009. Disponível em: <<http://www.rsc.org/Education/EiC/issues/2009Sept/Index.asp>>. Acesso em: 02 maio. 2018.

MATTOS, I.L; SHIRAIISHI, K. A.; BRAZ, A. D; FERNANDES, J. R. Peróxido de Hidrogênio: Importância e Determinação. **Quim. Nova**, Vol. 26, n. 3, p. 373-380, 2003.

MCCARTHY, Zachary et al. Individual based modeling and analysis of pathogen levels in poultry chilling process. **Mathematical Biosciences**, v. 294, p.172-180, dez. 2017.

MERCALF, Leonard; EDDY, Harrison P. Tratamento de Efluentes e Recuperação de Recursos. **McGraw Hill Brasil**, 5ed, p 1315, nov. 2015.

Ministério da Agricultura e Abastecimento (MAPA). **Portaria n.º. 46, de 10 de fevereiro de 1998**. Institui o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle: APPCC a ser implantado nas indústrias de produtos de origem animal. Brasília. 1998.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Circular n.º. 175 de 16 de maio de 2005**. Procedimento de Verificação dos Programas de Autocontrole. Brasília. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp.: Diagnóstico Laboratorial do Gênero *Salmonella*. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**, Brasília – DF, p. 10, 2011.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa n.º 20, de 21 de outubro de 2016**. Diário Oficial da União. 2016

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA**. VOLUME 3. Brasília. 2017.

MISRA, N.n.; SCHLÜTER, O.; CULLEN, P.j. Plasma in Food and Agriculture. **Cold Plasma in Food and Agriculture**, p.1-16, 2016.

MUNTHER, Daniel et al. Modeling cross-contamination during poultry processing: Dynamics in the chiller tank. **Food Control**, v. 59, p.271-281, jan. 2016.

MUKHOPADHYAY, Sudarsan; RAMASWAMY, Raghupathy. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p.666-677, mar. 2012.

NASCENTES, Clésia C. et al. Use of ultrasonic baths for analytical applications: a new approach for optimisation conditions. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 1, p.57-63, 2001.

NAKASHIMA, Sueli M. K.; ANDRÉ, Carmem D. S.; FRANCO, Bernadette D. G. M. Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. **Brazilian Journal of food technology**, p. 41-51, 2000.

NEOPROSPECTA. Análises Microbiológicas em Indústrias de Carnes. **Food Safety, Microbiologia**. 2017. Disponível em: <<https://blog.neoprospecta.com/analises-microbiologicas-em-industrias-de-carnes/>>. Acesso em: 12 março. 2018.

Normas para elaboração de trabalhos acadêmicos/ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Comissão de Normalização de Trabalhos Acadêmicos. -Curitiba: UTFPR, p. 115, 2008.

PANIWNYK, Larysa. Application of Ultrasound. **Emerging Technologies for Food Processing**, p.271-291, 2014.

PANIWNYK, L. Applications of ultrasound in processing of liquid foods: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p.794-806, 2017.

PETRAK, T et al. Bacteriological comparison of parallel and counter flow water chilling of poultry meat. **Meat Science**, v. 53, n. 4, p.269-271, dez. 1999.

PIÑON, M.i. et al. Microbiological properties of poultry breast meat treated with high-intensity ultrasound. **Ultrasonics**, v. 1, n. 1, p. 21, jan. 2018.

ROSÁRIO, Denes Kaic Alves do et al. Ultrasound improves chemical reduction of natural contaminant microbiota and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* on strawberries. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 241, p. 23-29, jan. 2017.

RODRIGUES, M. I; LEMMA, A. F. **Planejamento Experimental e Otimização de Processos**. 3ª. Ed. Campinas, SP, v.1, p. 313, 2014.

RUSSELL, Scott M. Controlling *Salmonella* in Poultry Production and Processing. Nova York. **CRC Press Taylor & Francis Group**, p. 247-255, out. 2012.

SANTIAGO et al. Volumetria de óxido-redução: determinação permanganométrica de peróxido de hidrogênio em três amostras de água oxigenada comercial. **Associação Brasileira de Química**. 2016.

SILVA, Neusely et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo – SP. v. 5 p. 1-9, 2017.

SOUZA, Germana C. et al. Característica microbiológica da carne de frango. **Agropecuária Científica no Semi-Árido – ACSA**, v. 10, n. 2, p. 12-17, abr - jun, 2014.

TECNILAB, SA. Geradores De Dióxido De Cloro. **SevernTrentServices**. Portugal, v. 01, 2018.

WANG, Huhu et al. Combination of a novel designed spray cabinet and electrolyzed water to reduce microorganisms on chicken carcasses. **Food Control**, v. 86, p.200-206, abr. 2018.

WEISSINGER, W. R.; BEUCHAT, L. R. Comparison of Aqueous Chemical Treatments to Eliminate *Salmonella* on Alfalfa Seeds. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 11, p.1475-1482, nov. 2000.

World Health Organization (WHO). **Food Safety**. Out, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>>. Acesso em: 01 maio. 2018.

World Health Organization (WHO). **Salmonella (non-typhoidal)**. Feb, 2018. Disponível em: <[http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))>. Acesso em: 01 maio. 2018.

WHO / FAO. **Food and Agriculture Organization of The United Nations**. 2009.

YASUI, K. Fundamentals of acoustic cavitation and sonochemistry. **In: Theoretical and Experimental Sonochemistry Involving Inorganic Systems**. Ashokkumar, M. p.1-30, 2011.

ZHOU, Siyuan et al. Novel generation systems of gaseous chlorine dioxide for *Salmonella* inactivation on fresh tomato. **Food Control**, v. 92, n. 1, p.479-487, maio. 2018a.

ZHOU, Siyuan et al. A novel gaseous chlorine dioxide generating method utilizing carbon dioxide and moisture respired from tomato for *Salmonella* inactivation. **Food Control**, v. 89, p.54-61, jul. 2018b.