

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

DANIELA COMPARSI LARANJA

**DESCONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS DE FRANGO POR ÁCIDO  
PERACÉTICO ISOLADO OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS  
ANTIMICROBIANOS**

Porto Alegre  
2021

DANIELA COMPARSI LARANJA

**DESCONTAMINAÇÃO DE CARÇAÇAS DE FRANGO POR ÁCIDO  
PERACÉTICO ISOLADO OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS  
ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo  
Co-orientadora: Prof. Dra. Patrícia da Silva Malheiros

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Laranja, Daniela Comparsi  
DESCONTAMINAÇÃO DE CARÇAÇAS DE FRANGO POR ÁCIDO  
PERACÉTICO ISOLADO OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS  
ANTIMICROBIANOS / Daniela Comparsi Laranja. -- 2021.  
125 f.  
Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Coorientador: Patrícia da Silva Malheiros.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e  
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Sanitizantes. 2. Ácidos orgânicos. 3.  
Contaminação cruzada. I. Tondo, Eduardo Cesar, orient.  
II. Malheiros, Patrícia da Silva, coorient. III.  
Título.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Rony (in memoriam) e Lídia (in memoriam) que sempre me apoiaram.*

*Obrigado por todo o carinho, amor e ensinamentos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Eduardo Cesar Tondo pela confiança nesses sete anos de trabalhos. Muito obrigada pela oportunidade de descobrir e me apaixonar pela pesquisa em Microbiologia de Alimentos.

A minha co-orientadora Dra. Patrícia Malheiros por seus ensinamentos, paciência e apoio. Muito obrigada por confiar em mim esta grande responsabilidade.

Agradeço à minha família, principalmente a meu querido Pai, pela inspiração como pesquisador e mestre em medicina veterinária pela UFRGS. Sou grata pela confiança, otimismo e incentivo para fazer a inscrição do doutorado. Infelizmente você teve que ir, mas meu amor e saudades serão eternos por ti.

Agradecimento especial a amiga Fabíola pela força e a ajuda nas muitas correções dos artigos. Tenho certeza que terá muito sucesso. Também as amigas Susana, Elis e Luana pelos conselhos. E as queridas IC e companheiras de laboratório Michelle e Carol pelas risadas e conversas animadas.

Ao Jorge pelo auxílio na autoclavagem e a Vera pela amizade e incansável ajuda burocrática. As colegas do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos (ICTA/UFRGS) obrigada pela boa convivência.

À UFRGS e ao PPGMAA pela qualidade do ensino público proporcionado. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Kalykim pelo suporte financeiro, tornando possível a realização deste trabalho. Aos funcionários do ICTA da portaria e limpeza por ajudar no recebimento e descarte das carcaças de frango.

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite e pelas contribuições dadas.

Enfim, meu muito obrigada a todos que de certa forma dividiram comigo este momento.

# DESCONTAMINAÇÃO DE CARÇAÇAS DE FRANGO POR ÁCIDO PERACÉTICO ISOLADO OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS ANTIMICROBIANOS

Autor: Daniela Comparsi Laranja  
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo  
Co-orientadora: Prof. Dra. Patrícia da Silva Malheiros

## RESUMO

O agronegócio é fundamental para a economia brasileira, sendo que o país é atualmente o maior exportador de carne de frango no mundo. Ainda que o controle sanitário realizado pelas indústrias seja rigoroso, carcaças de frango podem conter *Salmonella*, causando expressivas perdas econômicas e possíveis problemas de saúde pública. O objetivo do presente estudo foi avaliar a descontaminação de carcaças de frango por ácido peracético (PAA) isolado ou em combinação com outros antimicrobianos. Na primeira etapa do estudo, foi realizada uma revisão sobre os principais sanitizantes utilizados para descontaminação de carcaças de frango, a qual destacou a importância do PAA. Logo em seguida, a inativação de *Salmonella* pelo PAA a 0,07% e 0,14% foi avaliada *in vitro*. O mesmo produto também foi avaliado *in vitro* em combinação com ácido láctico (3% LA), ácido cítrico (3% CA), ácido fosfórico (1% PA), bissulfato de sódio (2% SBS) e com tratamento físico de ultrassom (US). Posteriormente, analisou-se a descontaminação por imersão de peles de frango inoculadas com um coquetel de diferentes sorovares *Salmonella*. As amostras foram tratadas com 0,07% e 0,14% de PAA isolado ou em combinação com 3% LA, 3% CA e 2% SBS, durante 15 segundos, 5 e 30 minutos. As peles tratadas com 0,07% e 0,14% de PAA + 2% SBS foram tratadas com US durante 5 e 30 minutos. Os resultados indicaram efeito combinado entre o PAA e LA, CA, PA e SBS. As concentrações para inibir o coquetel foram mais altas ou iguais aquelas testadas nas cepas individuais, sugerindo que o coquetel foi mais resistente aos sanitizantes. O PAA reduziu ~ 2 e 2,59 log UFC/g ( $p < 0,05$ ) de *Salmonella* nas peles submersas por 15 segundos, enquanto que nos tempos de 5 e 30 minutos a redução foi menor. O PAA a 0,14% + SBS 2% apresentou a maior redução (2,8 log UFC/g) nos três tempos. O US não aumentou o efeito antimicrobiano ( $p > 0,05$ ). O tratamento com PAA a 0,14% alterou a cor das peles. Em seguida, analisou-se a redução de *Salmonella* e microrganismos indicadores de higiene por PAA a 0,02%, concentração utilizada em tanques resfriadores de carcaças de frango. As amostras tratadas por imersão apresentaram reduções de 0,84, 0,98, 0,93 e 0,72 log UFC/mL de *Salmonella*, mesófilos aeróbios, *Enterobacteriaceae* e *E. coli*, respectivamente. As carcaças tratadas por aspersão tiveram reduções menores. Finalmente, avaliou-se o PAA a 0,07% na redução da contaminação cruzada entre carcaças. Os resultados demonstraram que a imersão reduziu ~2,0 log UFC/mL de mesófilos e *Salmonella*; e ~1,5 log UFC/mL de *Enterobacteriaceae* e *E. coli* nas carcaças e controlou a contaminação cruzada na água. O PAA em conjunto com Boas Práticas de Fabricação, pode contribuir para a redução de *Salmonella* e microrganismos indicadores em carcaças de frango e na água de lavagem.

**Palavras chaves:** Sanitizantes; Ácidos orgânicos; Contaminação cruzada.

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (125 p.) Agosto, 2021.

# DECONTAMINATION OF CHICKEN CARCASSES BY PERACETIC ACID ISOLATED OR IN COMBINATION WITH OTHER ANTIMICROBIALS

Autor: Daniela Comparsi Laranja  
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo  
Co-orientadora: Prof. Dra. Patrícia da Silva Malheiros

## ABSTRACT

Agribusiness is fundamental to the Brazilian economy, and the country is currently the largest exporter of chicken meat in the world. Although the sanitary control performed by the industries is rigorous, chicken carcasses may contain *Salmonella*, causing significant economic losses and possible public health problems. The objective of this study was to evaluate the decontamination of chicken carcasses by peracetic acid (PAA) alone or in combination with other antimicrobials. In the first stage of the study, a review of the main sanitizers used for decontamination of chicken carcasses was performed, which highlighted the importance of PAA. Then, the inactivation of *Salmonella* by PAA at 0.07% and 0.14% was evaluated in vitro. The same product was also evaluated in combination with lactic acid (3% LA), citric acid (3% CA), phosphoric acid (1% PA), sodium bisulfate (2% SBS) and with physical ultrasound (US) treatment. Subsequently, the immersion decontamination of chicken skins inoculated with a *Salmonella* cocktail was analyzed. Samples were treated with 0.07% and 0.14% PAA alone or in combination with 3% LA, 3% CA and 2% SBS for 15 seconds, 5 and 30 minutes. Skins treated with 0.07% and 0.14% PAA + 2% SBS were treated with US for 5 and 30 minutes. The results indicated combined effect between PAA and LA, CA, PA and SBS. The concentrations to inhibit the cocktail were higher than or equal to those tested on the individual strains, suggesting that the cocktail was more resistant to the sanitizers. PAA reduced ~ 2 and 2.59 log CFU/g ( $p < 0.05$ ) of *Salmonella* in the skins submerged for 15 seconds, while at the 5 and 30 minutes times the reduction was less. PAA at 0.14% + SBS 2% showed the highest reduction (2.8 log CFU/g) in all three times. US did not increase the antimicrobial effect ( $p > 0.05$ ). Treatment with PAA at 0.14% altered the color of the hides. Then, the reduction of *Salmonella* and indicator hygiene microorganisms by PAA at 0.02%, a concentration used in shiller tanks of chicken carcasses, was analyzed. The samples treated by immersion showed reductions of 0.84, 0.98, 0.93 and 0.72 log CFU/mL of *Salmonella*, aerobic mesophiles, *Enterobacteriaceae* and *E. coli*, respectively. Carcasses treated by spray had smaller reductions. Finally, PAA at 0.07% was evaluated in reducing cross-contamination between carcasses. The results showed that soaking reduced ~2.0 log CFU/mL of mesophiles and *Salmonella*; and ~1.5 log CFU/mL of *Enterobacteriaceae* and *E. coli* in the carcasses and controlled cross-contamination in the water. The EAP in conjunction with Good Manufacturing Practices, can contribute to the reduction of *Salmonella* and indicator microorganisms on chicken carcasses and in the washing water.

**Key words:** Sanitizers; Organic acids; cross-contamination.

<sup>1</sup>Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

(125 p.) Agosto, 2021.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos.....	3
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
3.1	Processamento da Carne de Frango.....	4
3.2	Indicadores no Processamento de Frango.....	6
3.3	Salmoneloses.....	7
3.4	Contaminação de Carcaças de Frango por <i>Salmonella</i> .....	8
3.5	Lavagem e desinfecção de carcaças.....	9
3.6	Ácido Peracético.....	12
3.7	Bissulfato de Sódio.....	13
3.8	Ácidos Orgânicos.....	14
3.8.1	Ácido Láctico.....	14
3.8.2	Ácido Cítrico.....	15
3.9	Ácido Fósforico.....	15
3.10	Ultrassom (US).....	16
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1	Culturas Bacterianas.....	18
4.2	Preparação dos Antimicrobianos.....	18
4.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima CIM.....	19
4.4	Determinação da Concentração Bactericida Mínima CBM.....	19
4.5	Tratamento e Contagem de <i>Salmonella</i> na Pele de Frango.....	20
4.6	Recebimento e Preparação das Carcaças de Frango.....	21
4.7	Tratamentos químicos das carcaças.....	21
4.8	Tratamento de Aspersão.....	22
4.9	Tratamento de Imersão.....	22
4.10	Análise da Contaminação Cruzada.....	22
4.11	Contagem de Microrganismos nas Carcaças e na Água de Enxague.....	23
4.12	Atributos de Cor e Textura.....	24
4.13	Análises Estatísticas.....	25
<b>5.</b>	<b>ARTIGOS</b> .....	<b>26</b>
5.1	<b>Artigo 1.</b> Antimicrobial Challenges Applied to the Broiler Processing: A Review.....	27
5.2	<b>Artigo 2.</b> <i>Salmonella</i> inactivation and changes on texture and color of chicken skin treated with antimicrobials and ultrasound.....	56
5.3	<b>Artigo 3.</b> Application of Peracetic Acid by Spray or Immersion in Chicken Carcasses to Reduce Cross-Contamination in the Slaughter Process.....	80
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>106</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>114</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>115</b>
<b>9.</b>	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>124</b>



## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Artigo 1.</b>	
<b>Tabela 1.</b> Previously published studies on the effect of chlorine dioxide (CD), acidified sodium chlorite (ASC), trisodium phosphate (TSP), peroxyacetic acid (PAA), lactic acid (LA), citric acid (CA), cetylpyridinium chloride (CPC) and sodium bisulfate salt (SBS) on raw meat.....	42
<b>Artigo 2.</b>	
<b>Tabela 1.</b> Concentrations (%) and pH of antimicrobial solutions used in this study.....	60
<b>Tabela 2.</b> Treatments in chicken skin and time exposure .....	62
<b>Tabela 3.</b> Minimum inhibitory concentrations (%) of treatments against <i>Salmonella</i> enterica strains and cocktail.....	64
<b>Tabela 4.</b> Minimum bactericidal concentration (%) of treatments against <i>Salmonella</i> enterica strains and cocktail.....	66
<b>Tabela 5.</b> Color and texture of chicken skin treated with various levels of peracetic acid (PAA) or sodium bisulfate (SBS) and sonicated (US) during 15 seconds, 5 and 30 minutes.....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Artigo 1</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Schematic diagram showing the main stages of the chicken slaughter process and possible contamination.....	<b>29</b>
<b>Figura 2.</b> Most and least acceptable interventions based on studies by LA MacRitchie (2014) and UK Food Standards Agency's, 2017.....	<b>47</b>
<b>Artigo 2</b>	
<b>Figura 1.</b> Mean reductions in <i>Salmonella</i> counts (log <sub>10</sub> CFU/g) after treatment at different times: (A) 15 seconds, (B) 5 minutes and (C) 30 minutes.....	<b>67</b>
<b>Artigo 3</b>	
<b>Figura 1.</b> Schematic of the sampling procedure followed in the current experiment cross-contamination (n = 24).....	<b>86</b>
<b>Figura 2.</b> Mesophilic aerobic, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Salmonella</i> spp and <i>E. coli</i> , recovered from carcasses treated with (A) 0.02% PAA applied by spray or immersion and (B) 0.07% PAA applied by immersion.....	<b>89</b>
<b>Figura 3.</b> Cross-contamination test for (I) mesophilic aerobic, (II) <i>Enterobacteriaceae</i> , (III) <i>Salmonella</i> spp and (IV) <i>E. coli</i> , recovered from inoculated carcasses (n= 24) treated with 0.07% PAA in an immersion tank reported as mean log colony-forming units / per sample.....	<b>94</b>
<b>Figura 4.</b> Cross-contamination test for mesophilic aerobic, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Salmonella</i> spp and <i>E. coli</i> , recovered from rinse treated with 0.07% PAA in immersion reported as mean count log colony-forming units per sample.....	<b>96</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
AAFCO	Associação dos Funcionários Americanos de Controle de Alimentos
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CA	Ácido Cítrico
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCP	Pontos de Controle Críticos Compulsórios
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ETA	Enfermidades Transmitidas por Alimentos
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HEDP	<i>ácido 1-hidroxi-etilideno-1,1-difosfônico</i>
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i>
LA	Ácido Lático
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

nBPW	Neutralizer buffered peptone water
PA	Ácido Fosfórico
PAA	Ácido Peracético (ácido peroxiacético)
PAC	Programas de Autocontrole
PCA	Plate count agar
PCC	Pontos Críticos de Controle compulsórios
PCC1B	Ponto crítico de controle biológico
PPHO	Procedimentos Padrão de Higiene Operacional e Pré-Operacional
PPM	Partes por milhão
SBS	Sal Bisulfato de Sódio
SCVPH	Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health
UE	União Europeia
UFDA	<i>Food and Drug Administration</i>
US	Ultrassom
USDA	U.S. Department of Agriculture
USNLM	United States National Library of Medicine
WHO	Organização Mundial da Saúde
XLD	Xilose lisina desoxicolato

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil tem se destacado como grande produtor e exportador de produtos de origem animal. Desde o final da década de 90, poucos países cresceram tanto no comércio internacional do agronegócio quanto o Brasil, sendo que, desde o ano de 2004, o país é o maior exportador de carne de frango no mundo (MAPA, 2019).

Para atender as exigências do mercado nacional e internacional, o Brasil investiu fortemente em tecnologia e na inocuidade dos produtos de origem animal, implementando programas de segurança de alimentos, os quais nos abatedouros-frigoríficos do Brasil, são conhecidos como Programas de Autocontrole (PAC). Esses programas incluem as Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), dentre outros (ABPA, 2008).

Ainda que controles rigorosos estejam implementados nos abatedouros-frigoríficos brasileiros, *Salmonella* e outros microrganismos podem contaminar as carcaças de aves durante o processo, uma vez que eles fazem parte da microbiota natural desses animais. Na verdade, *Salmonella* e outros microrganismos podem contaminar as aves em diversos momentos. Por exemplo, durante a criação nas fazendas pode haver a contaminação horizontal entre as aves e, no transporte das mesmas, pode ocorrer a defecação e posterior fixação de bactérias nas penas e na pele. No abatedouro-frigorífico, o conteúdo gastrintestinal pode extravasar e contaminar equipamentos, utensílios e carcaças, e isso pode ocorrer com certa frequência, considerando a quantidade de aves abatidas. Um meio de controlar ou mesmo melhorar a segurança e aumentar a vida de prateleira destas carcaças contaminadas durante o processamento é descontaminá-las, durante ou no final da linha de produção. Esse procedimento é recomendado pelo *Codex Alimentarius* e diversos países o realizam corriqueiramente. O método ideal de descontaminação não deve alterar a aparência, cheiro, sabor ou propriedades nutricionais das carcaças, nem deixar resíduos ou ser perigoso ao ambiente. Além disso, ele deve ser barato, conveniente de aplicar, estável e inativar microrganismos deteriorantes, bem como bactérias patogênicas, como *Salmonella*.

Atualmente, a legislação brasileira determina que as carcaças de frango podem ser descontaminadas somente com água com cloração máxima de 5 ppm. Porém, a Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou a Instrução Normativa Número 30 (IN 30, 2017), estabelecendo os procedimentos para submissão de proposta, avaliação, validação e implementação de inovações tecnológicas a serem implementadas em qualquer etapa da fabricação de produtos de origem animal, em estabelecimentos com registro no DIPOA/DAS. A IN 30 define que inovação tecnológica pode ser um processo, equipamento, substância ou material isolado ou em combinação, tecnologicamente novo, que proporcione a melhoria do processo de fabricação ou de qualidade do produto de origem animal brasileiro, ou seja a descontaminação de carcaças pode ser uma inovação tecnológica. No Estados Unidos da América (EUA), os sanitizantes aprovados para uso avícola são descritos na Diretriz FSIS 7120.1 Revisão 9 (USDA-FSIS, 2011a). Naquele país, os compostos liberadores de cloro (dióxido de cloro, hipoclorito de sódio, cloreto de sódio acidificado e monocloramina) têm sido muito utilizados para a prevenção da contaminação cruzada entre carcaças em sistemas de resfriamento por imersão e em toda a planta de processamento de aves (McKee, 2012). No entanto, a eficácia do cloro na redução bacteriana diminui com o aumento do pH e da carga orgânica. Nos últimos anos, o ácido peracético (PAA), uma combinação de ácido acético e peróxido de hidrogênio, substituiu o cloro na indústria avícola nos EUA para descontaminação microbiana, durante o processamento de aves. Para aplicações antimicrobianas em aves de corte, a concentração máxima permitida é 2000 ppm em imersão pós-*chiller* (USDA-FSIS, 2011a). Embora os antimicrobianos tenham sido validados contra *Salmonella* quando aplicados em resfriadores (*chiller*), há poucos estudos sobre sua aplicação por imersão ou aspensão pós-*chiller*, onde os parâmetros operacionais são diferentes, ocorrendo curto tempo de permanência e menor carga orgânica em comparação com o resfriador primário.

Além disso, ácido peracético combinado com outros antimicrobianos, tais como ácido cítrico (CA), ácido láctico (LA), ácido fosfórico (PA), sal bissulfato de sódio (SBS) e ou ultrassom, podem ser explorados como possíveis intervenções estratégias para a descontaminação de carcaças em instalações de processamento de aves.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a descontaminação de carcaças de frango por ácido peracético isolado ou em combinação com outros antimicrobianos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Determinar a concentração inibitória e bactericida mínima de ácido peracético isolado ou combinado com ácido láctico, ácido cítrico, ácido fosfórico e bissulfato de sódio sobre cinco sorovares de *Salmonella* separados e compondo um coquetel;
- 2.2.2 Avaliar a ação antimicrobiana do PAA isolado ou combinado com ácido láctico, ácido cítrico, ácido fosfórico, bissulfato de sódio e ultrassom sobre a inativação de *Salmonella enterica* artificialmente inoculada em peles de frango;
- 2.2.3 Avaliar alterações de cor e textura das peles de frango após os tratamentos antimicrobianos;
- 2.2.4 Determinar a eficácia dos métodos de aplicação (aspersão ou imersão) de 0,02% de PAA contra um coquetel de *Salmonella* artificialmente inoculada em carcaças de frango e microrganismos naturalmente presentes.
- 2.2.5 Avaliar a ação antimicrobiana de 0,07% de PAA aplicado pelo método de imersão em carcaças de frango;
- 2.2.6 Verificar se a utilização de PAA na água de enxague seria eficiente para evitar contaminação cruzada entre carcaças de frango.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Processamento de carne de frango

O processamento moderno de carne de frango é rápido e contínuo, apresentando taxas de até 12.000 aves por hora. Frangos saudáveis que chegam às plantas de processamento, podem transportar bactérias, tanto internamente como externamente (Hinton et al., 2004) O processamento inicia-se com o abate das aves, o qual envolve várias etapas que são divididas em duas áreas: “zona suja (estágios de atordoamento, sangria, escaldagem, depenagem e evisceração) e “zona limpa” (lavagem e resfriamento) (Escudero-Gilete et al., 2005). De acordo com Belluco et al. (2016), algumas etapas adicionais, frequentemente envolvendo lavagem, podem ser aplicadas em diferentes níveis. As principais diferenças no processo entre diversos países estão ligadas ao resfriamento e ao uso de tratamentos de descontaminação química.

A maioria dos matadouros-frigoríficos europeus (80%) utiliza refrigeração a ar, em vez de refrigeração por imersão em água, que é o padrão nos Estados Unidos (Sanchez, et al., 2002) e também do Brasil. A etapa de resfriamento das carcaças é determinante para a qualidade e segurança do produto. Nessa etapa, as carcaças de frango precisam passar por redução de temperatura de mais de 40 °C para 4 °C. Durante o resfriamento, a temperatura mais alta é encontrada no centro do peito de frango. Os três métodos mais utilizados para resfriar carcaças de frango são imersão em água, aspersão de água e o jato de ar. Nos EUA e no Brasil, dois dos maiores produtores de aves do mundo, no resfriamento por imersão as carcaças são movimentadas em tanques, contendo água gelada ou uma mistura de gelo e água (James, et al., 2006). Nos EUA é utilizado rotineiramente resfriamento rápido, pois o Departamento de Agricultura, Segurança de Alimentos e Serviço de Inspeção (FSIS/USDA) exige que as aves sejam refrigeradas abaixo de 4,4 °C, após 4 h do abate (Savell, et al., 2005).

O MAPA (Brasil, 1998) exige o uso de, pelo menos, dois tanques no processo de resfriamento de aves. No primeiro, o *pré-chiller*, a temperatura máxima é até 16 °C e a quantidade de renovação da água é de 1,5 L por carcaça de frango. Em um segundo tanque, o *chiller*, a água de resfriamento deve estar abaixo de 4 °C, e sua renovação



deve ser de 1 L por carcaça. Este tanque é construído em aço inoxidável e em seu interior as carcaças de frango são deslocadas por meio de uma rosca sem fim, em contra-corrente com a água de resfriamento. Durante a imersão (*pré-chiller*), as carcaças absorvem água que entra nos espaços intercelulares criados durante o *rigor mortis* (Dufour & Renou, 2002). No Brasil, a absorção de água pelas carcaças permitida é de no máximo 8% em peso na etapa de *pré-chiller* e 6% na etapa de congelamento (Brasil, 1998).

Programas oficiais focados na segurança de produtos de origem animal, incluindo carne de frango, foram implementados no Brasil (Brasil, 1997a; Brasil, 1997b; Brasil, 1998, Brasil, 2006). Abate de frangos de corte sob inspeção federal contém quatro Pontos Críticos de Controle compulsórios (PCC): controle de resíduos de drogas na recepção das aves; detector de metais durante a embalagem secundária; e 2 PCC biológicos identificadas como PCC1B e PCC2B. O PCC2B corresponde ao controle de temperatura nas carcaças e cortes ( $\leq 4$  °C até 4 horas) para resfriamento ou congelamento, e PCC1B verifica a presença de contaminação biliar e gastrointestinal (GI), após evisceração completa e antes do resfriamento (Brasil, 2006). Antes de chegar ao PCC1B, 100% das carcaças são inspecionadas visualmente, quanto à presença de contaminação GI. Como a presença visível de GI e bile em carcaças são considerados indicadores da presença de *Salmonella* (Brasil, 1998), as empresas devem tomar ação corretiva quando detecta-se este tipo de contaminação.

Até outubro de 2011, a indústria avícola no Brasil deveria remover a contaminação gastrointestinal nas carcaças detectadas durante a etapa de inspeção visual pela prática do refile (Brasil, 2011a) sem utilização de água conforme a portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998 (Brasil, 1998). A prática do refile consiste na remoção da contaminação visível com auxílio de faca, porém este método é antieconômico, pois partes nobres, como o peito e coxa podem ser removidas. O corte de carcaças resulta na perda de produtos e na necessidade de mão de obra extra. Em vista disso, a portaria foi alterada pela resolução nº 8/2018 que autoriza o emprego de lavagem de carcaças no abate de aves para remoção do conteúdo gastrointestinal visível presente nas superfícies internas e externas das carcaças antes do *pré-chiller*, como alternativa a prática do refile. O sistema de lavagem de carcaças deve estar localizado após a inspeção *post mortem* e antes da lavagem final por aspersion das carcaças. Essa medida tem como objetivo diminuir a manipulação no processo de abate, reduzir

o número de funcionários na etapa de inspeção visual de carcaças de aves, bem como minimizar os riscos de falhas humanas na identificação de contaminações gastrintestinais visíveis. Entretanto, compete ao serviço de inspeção de produtos de origem animal autorizar o emprego deste sistema, mediante a comprovação da efetividade do protocolo apresentado pela empresa.

A lavagem de carcaças de frangos contaminadas é utilizada há muitos anos nos Estados Unidos, após a comprovação de sua eficiência na eliminação de microrganismos patogênicos (Hinton et al., 2009). Franchin et al. (2010) identificaram que o uso de lavagem das carcaças juntamente com as BPF e a implantação de APPCC, resultam em um eficiente e seguro controle microbiológico. Do mesmo modo, Venturini et al. (2007) afirmaram que a sanitização de carcaças com sanitizantes pode ser incluída como operação de rotina no processo de abate para redução da contagem microbiana.

### **3.2 Indicadores no Processamento do Frango**

O estudo do impacto das etapas do abate na higiene da carcaça é importante para a gestão correta do processamento do frango. A implementação da higiene é realizada através de duas ações complementares: controle rigoroso dos estágios propensos ao aumento da contaminação microbiana e melhoria dos estágios onde ocorrem redução da contaminação bacteriana. A redução das bactérias deteriorantes propicia aumento da vida de prateleira, enquanto a eliminação dos microrganismos patogênicos, ao diminuir a probabilidade de um surto alimentar, proporciona um efeito positivo na saúde pública (Belluco et al., 2016). Várias bactérias podem ser utilizadas como indicadores de higiene do processo de carnes. Dentre elas, mesófilos totais, *Enterobacteriaceae* e *E. coli* são frequentemente utilizadas. Enquanto os microrganismos mesófilos totais indicam a contaminação geral de produtos ou superfícies, as bactérias da espécie *E. coli* são utilizadas como indicadoras de contaminação fecal em alimentos (Smooth & Pierson, 1997). A presença de *E. coli* é correlacionada com a presença de *Enterobacteriaceae*, cujas contagens elevadas nas carcaças de aves são indicadores de processamento inadequado ou não higiênico, manuseio e/ou condições de armazenamento inadequados (Whyte et al., 2004).

Como a contaminação encontrada em carcaças de aves decorrente do abate geralmente é proveniente de vazamentos intestinais, *E. coli* é considerado um organismo indicador mais apropriado do que a contagem de microrganismos mesófilos. Nos Estados Unidos, *E. coli* foi identificado como um organismo indicador útil para verificar a adequação dos planos APPCC implementados nos abatedouros de bovinos, suínos e aves (Belluco et al., 2016). Na União Europeia, os critérios de higiene de processo para carcaças de frangos de corte são avaliação pela ausência de *Salmonella* em amostras de pele cervical pós-chiller (Regulamento CE nº 1086/2011 e emendas) e na superfície da carcaça (400 cm<sup>2</sup>) (2073/2005).

### 3.3 Salmoneloses

A salmonelose continua sendo uma das zoonoses mais frequentemente transmitidas por alimentos em todo o mundo (Brasil, 2018; WHO, 2019a). Grandes surtos de *Salmonella* são geralmente divulgados; no entanto, 60% a 80% de todos os casos de salmonelose não são reconhecidos como parte de um surto identificado ou não são diagnosticados (WHO, 2019b). Segundo *European Food Safety Authority* (EFSA) *Salmonella* é a segunda causa mais comum de doença transmitida por alimentos na União Europeia (EFSA, 2018). Nos Estados Unidos, mais de 1 milhão de pessoas são afetadas e quase 450 morrem a cada ano (CDC 2011a). As fontes mais frequentes de infecções humanas são produtos alimentícios de origem animal, principalmente carnes de frango (CDC, 2011b). Dentre os fatores identificados como causadores de salmoneloses no sul do Brasil estão os alimentos expostos à temperatura ambiente por mais de duas horas, refrigeração e manipulação inadequadas, falta de higienização dos utensílios e equipamentos, além de contaminação cruzada (Costalunga et al., 2002).

Embora haja mais de 2600 sorovares de *Salmonella* e todos são considerados potencialmente patogênicos, dos 7.013 (87%) isolados de surtos de *Salmonella* sorotipados, os três mais comuns foram Enteritidis (2,6 por 100.000 habitantes), Newport (1,6) e Typhimurium (1,5), semelhantes aos de 2015-2017 (CDC Report 2018). A maioria das pessoas com salmonelose desenvolve diarreia, febre e cólicas abdominais entre 12 e 72h após a infecção a qual dura de quatro a sete dias. Entretanto, alguns sorovares de *Salmonella*, como *S. Typhi* e *S. Paratyphi* podem causar doenças

cujos danos são considerados graves, como a febre tifoide, que resulta em septicemia, tem um maior tempo de incubação e alta taxa de mortalidade, e a paratifoide, que tende a ter sintomas mais brandos que a febre tifóide, provocando, mais comumente, gastroenterites (Hennemann et al., 2017). A febre tifoide acomete o homem e causa sintomas que podem persistir por até nove semanas, e o patógeno pode ser transmitido através de água ou de alimentos contaminados. Muitos portadores não desenvolvem sintomas, e são chamados de portadores assintomáticos. No Brasil, entre os anos de 1962 e 1991 foi avaliada a distribuição de diferentes sorovares isolados em aves. As amostras analisadas pelo Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz foram isoladas em aviários de doze estados brasileiros. S. Heidelberg foi classificada como muito frequente, ou seja, com frequência entre 65% e 67%, sendo a maioria (cerca 95%) proveniente do estado de Santa Catarina (Hofer, 1997). Pesquisas demonstram que S. Heidelberg tem sido isolada em diferentes etapas do processamento de frangos na região sul do país, e que, frequentemente, tem apresentado altas taxas de resistência a antimicrobianos (Giuriatti et al., 2017; Mion et al. 2014; Pulido-Landínez et al. 2013). A frequência de isolamento tem aumentado em alguns abatedouros de aves brasileiros, despertando inquietação e necessidade de controle. Mesmo aplicando rígidos padrões de BPF, o sorovar S. Heidelberg tem sido isolado com frequência de produtos de aves brasileiros.

### **3.4 Contaminação de carcaças de frango por *Salmonella***

Mesmo com todos os cuidados durante o abate e processamento das aves, em 2010, a União Europeia reconheceu que 6,0% do total de surtos de origem alimentar (N = 5.262) foram relacionados com produtos de aves (EFSA, 2012). Nos EUA aproximadamente 33,3% do total de doenças humanas transmitidas por alimentos são associadas a produtos avícolas contendo *Salmonella*, gerando perdas econômicas ao país de mais de US \$ 960 milhões por ano (Callaway et al., 2008).

O Brasil, através da Instrução Normativa nº 20/2016, estabeleceu o programa de controle e monitoramento de *Salmonella* spp. na cadeia de produção de frangos e perus, visando melhoria nas medidas de controle do processo para garantir a segurança do alimento. Além disso, a IN 20 visa formar um sistema de informação que avalie a contaminação dos produtos, viabilizando a determinação do nível adequado de proteção aos consumidores.

No período de fevereiro de 2017 a março de 2018, 17.97% das amostras de carcaças de frango coletadas em todo o Brasil (N = 2.592) apresentaram *Salmonella* spp., dos quais 21,67% violaram o número máximo de amostras aceitáveis para presença da bactéria por ciclo. Estes ciclos violados concentraram-se em 44 (33,33%) abatedouros-frigoríficos de frango do Brasil. Dentre os sorovares de *Salmonella enterica* isolados, destacam-se a ocorrência de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, representando 0,25% e 0,51%, respectivamente, das culturas isoladas de carcaças de frango.

Portanto, mesmo existindo controles rígidos e seguindo o regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves (Brasil, 1998) há números consideráveis de carcaças que apresentam *Salmonella* spp. no Brasil.

Pode-se diminuir a prevalência e os níveis de bactérias patogênicas e deteriorantes em carcaças de aves através da correta aplicação de sistemas preventivos como o APPCC e demais programas de autocontrole. A descontaminação de carcaças de frango pode auxiliar tais sistemas na redução das concentrações e prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango, mas não pode, de forma alguma, substituí-los. O método ideal de descontaminação de carcaças não deve alterar a aparência, cheiro, sabor ou propriedades nutricionais, nem deixar resíduos ou causar perigo ao meio ambiente. Além disso, não deve encontrar objeções dos consumidores ou dos órgãos legisladores; deve ser barato e conveniente de aplicar, além de aumentar o prazo de validade, através da inativação de bactérias patogênicas e deteriorantes.

Desde que essa estratégia seja seguida, os tratamentos antimicrobianos podem constituir um elemento útil para melhorar ainda mais o *status* microbiológico das carcaças de aves (del Río et al., 2007).

### **3.5 Lavagem e Desinfecção de Carcaças**

As Diretrizes do *Codex Alimentarius* CAC/GL (2011) para o controle de *Campylobacter* e *Salmonella* em carne de frango demonstram que a prevalência de *Salmonella* em carcaças de frango pode ser reduzida, através da aspersão de água clorada (20-50 ppm), aplicada após a depenagem e evisceração. O mesmo documento também traz que a imersão das carcaças em Fosfato Tri-Sódico (TSP) reduziu a prevalência de *Salmonella* de 72% para 4% e que a lavagem de carcaças com Clorito

de Sódio Acidificado (ASC) ou TSP foram capazes de reduzir 1,3 log UFC/mL de *Campylobacter*. A imersão de carcaças de frango, pós-chiller, onde havia ASC (750 ppm) reduziu em 16% a prevalência de *Salmonella*. As mesmas diretrizes relatam que o uso de cloro (20-34 ppm) ou dióxido de cloro (3-5 ppm) reduziu a prevalência de *Salmonella* das carcaças em 12% e 9%, respectivamente (Codex alimentarius, 2011). Esses e outros produtos têm sido utilizados para a descontaminação de carcaças de frango em vários países, diminuindo de forma efetiva a contaminação de carcaças de aves. Nas instalações de abate na América do Norte é uma prática normal submeter carcaças de carne vermelha e de aves a uma variedade de procedimentos de descontaminação. Na União Europeia, a descontaminação de carcaças com qualquer substância além de água potável não é permitida (Diretriz 71/118 / EC). Contudo, o Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos gêneros alimentícios de origem animal (OJEC, 2004), constitui a base jurídica para permitir a utilização de antimicrobianos para remover a contaminação superficial de produtos de origem animal.

Entretanto, algumas pesquisas sugerem que a descontaminação pode tornar a superfície da carcaça suscetível à multiplicação de bactérias patogênicas, devido à remoção da microbiota inicial (Hugas & Tsigarida, 2008; Somers et. al., 1994). Assim, a Federação de Veterinários da Europa (FVE, 2005) recomenda que a descontaminação de carcaças não deve ser permitida, a menos que tenha sido demonstrado que tais técnicas são seguras, levando em conta o potencial microrganismo patogênico envolvido. A falta de dados científicos relativos aos perigos associados à utilização de sanitizantes em aves de corte causou a rejeição de uma proposta da Comissão Europeia que autorizaria a utilização de substâncias antimicrobianas para remover a contaminação da superfície das carcaças de aves (OJEU, 2009). Nos últimos anos, as tecnologias para descontaminação de carcaças foram investigadas como uma etapa adicional de processamento, a fim de reduzir os níveis de perigos biológicos significativos para a saúde pública. Estes podem ser classificados como metodologias de descontaminação química ou física, incluindo o uso de água ozonizada ou hiperclorada (Waldroup, 1993; Gorman et. al., 1995; Whyte et. al., 2001), peróxido de hidrogênio (Fletcher et al., 1993), ácidos orgânicos (Bautista et. al., 1997; Hwang & Beuchat, 1995), polifosfatos (Rodriguez de Ledesma et. al., 1996; Whyte et. al., 2001), água quente (Cox et al., 1974; Kochevar et. al., 1997; Graves

Delmore et. al., 1997; Berrang et. al., 2000) e pasteurização a vapor (Kozempel et. al., 2000).

Além da seleção do sanitizante, o ponto e a maneira de aplicação também devem ser levados em consideração. Na linha geral de abate de frangos, a limpeza e desinfecção são geralmente realizadas em três seções: 1) durante a escaldagem, 2) antes e após a evisceração e 3) nos tanques de resfriamento. No entanto, a alta frequência de contaminação cruzada e acúmulo de carga orgânica, principalmente no pré-*chiller* e no *chiller*, pode prejudicar a eficácia da descontaminação, levando a altos níveis de contaminação microbiana no produto final. Portanto, a intervenção de descontaminação complementar após o *chiller*, como parte de múltiplas intervenções sequenciais, é necessária para melhorar um ponto fraco no processo de abate.

A aplicação de um processo de lavagem e desinfecção com sanitizante em carcaças resfriadas, considerado como um complemento para todo o sistema de descontaminação, ajuda a eliminar microrganismos que sobreviveram, após o final do processo. Essa intervenção é normalmente conduzida no tanque do *chiller* ou após este. A vantagem da intervenção ser em um tanque de imersão pós-*chiller* é o curto tempo de contato com o sanitizante, ou seja, menos chances de causar alterações sensoriais negativas, e o controle mais eficaz da concentração do sanitizante. Além disso, uma vez que a maior parte da matéria orgânica solúvel foi lavada das carcaças pelo fluxo de água em contracorrente no *chiller*, a eficácia de alguns sanitizantes pode ser melhorada (Chen et al., 2014; Nagel et al., 2013). Por outro lado, teria a desvantagem de aumentar o consumo de água e conseqüentemente os custos de mais uma etapa. Comparado com os tratamentos de imersão, pulverização e a aspersão, seria mais fácil de implementar a aspersão em relação às operações móveis de abate de frango e reduziria o consumo de água e sanitizantes (Purnell, et. al., 2013; EFSA 2005). A pulverização também tem a vantagem de fácil implementação na linha, porém não diminui o consumo de água, visto que difere da aspersão por não ter pressão no dispositivo que emana a água, criando um efeito tipo “chuveiro” contínuo. É importante destacar que embora a descontaminação de carne de aves possa ajudar a reduzir as infecções humanas causadas por alimentos, a higiene do processo para evitar a contaminação nunca deve ser negligenciada. A seguir a descrição dos antimicrobianos químicos e o antimicrobiano físico ultrassom utilizados nas análises para descontaminação de carcaças nesta Tese.

### 3.6 Ácido Peracético

O ácido peracético ou peroxiacético (PAA) é um peroxiácido composto por uma mistura em equilíbrio de ácido acético e peróxido de hidrogênio ( $C_2H_4O_3$ ) (Joshi, et al., 2013). O uso de PAA em carcaças de aves foi aprovado pela *Food and Drug Administration* dos EUA (US FDA, 2019) e classificado como Geralmente Considerado Seguro (GRAS) e considerado um auxiliar de processamento pelo USDA FSIS. Para uso no resfriador de aves principal (*chiller*), a concentração máxima permitida é de 220 ppm enquanto que no tanque de imersão pós-*chiller* a concentração máxima permitida é de até 2000 ppm (USDA-FSIS, 2019). O PAA apresenta algumas vantagens sobre outros antimicrobianos como o cloro, ou seja, não forma subprodutos químicos prejudiciais, enquanto o cloro pode formar clorofórmio, cloraminas e bromodiclorometano quando em contato com grandes quantidades de matéria orgânica durante o processamento das aves. Esses subprodutos são considerados cancerígenos humanos e podem representar um potencial risco ocupacional para os trabalhadores da fábrica.

Viola et al. (2018) definiram que um sanitizante com um potencial redox mais alto tende a ser um bactericida mais forte. O PAA tem um potencial redox de 1,385 V, que é superior ao cloro (1,361 V), dióxido de cloro (1,174 V) e muitos outros sanitizantes, como ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio (Zhang, Brown e Hu, 2018). O PAA possui propriedade ácida que altera a estrutura e permeabilidade da membrana celular, causando extravasamento dos metabólitos internos da célula. Além disso, sua propriedade ácida propicia penetrar na célula e afetar negativamente às atividades intracelulares, como a replicação do DNA e a síntese de proteínas, levando à morte celular. O PAA também é um forte agente oxidante que rompe as ligações sulfidrilas (SH) e enxofre (SS) das enzimas e das paredes celulares (Baldry & Fraser, 1988; Jolivet-Gougeon, et al., 2006; Kataria et al., 2020).

PAA não apresenta risco de toxicidade ambiental e também não necessita enxágue após aplicação em carcaças de frango. Entretanto, existem diferentes formulações comerciais cujo componente principal é PAA que podem conter em sua fórmula estabilizantes tóxicos, como o ácido 1-hidroxietilideno-1,1-difosfônico (HEDP). Como HEDP é um composto não-biodegradável a EFSA recomenda monitoramento de seus resíduos, pois podem poluir o ambiente quando entram na estação de tratamento



de esgoto (EFSA, 2011). O PAA, em formulações comerciais, pode possuir diferentes concentrações entre ácido acético, água e peróxido de hidrogênio (USNLM, 2011). Portanto, diferentes concentrações podem ocasionar alterações de qualidade na carcaça, como branqueamento, podendo levar a produtos com qualidade inaceitável. Em vista disso, a abordagem ideal é combinar PAA com outros antimicrobianos químicos ou físicos para usar níveis mais baixos de PAA, mas manter ou mesmo aumentar a eficácia antimicrobiana do composto. Por todas essas características, atualmente, o PAA é um dos sanitizantes mais utilizados em indústrias de alimentos e na descontaminação de carcaças de aves em diferentes países (Bourassa, et al., 2021) e, por esse motivo, assumiu papel de destaque nessa Tese.

### 3.7 Sal Bissulfato de Sódio

O bissulfato de sódio (SBS), é um sal ácido granular seco, cuja a fórmula química é  $\text{NaHSO}_4$ . É facilmente solúvel em água e se dissocia em íons sódio, hidrogênio e sulfato em solução (Sun et al., 2008). O SBS é classificado como aditivo de uso geral para alimentos para animais na Associação dos Funcionários Americanos de Controle de Alimentos (AAFCO). Em 1998, foi classificado pela Food and Drug Administration (FDA) como GRAS e adequado para uso em alimentos (Li et al. 1997)

O SBS demonstra a capacidade de diminuir o pH extracelular para cerca de 2 (Knueven, 1999). Isso leva a uma diminuição no pH extracelular drástica o que faz com que a *Salmonella* reduza o pH citoplasmático para manter um estado neutro (Hill et al., 1995). Essa resposta é incrivelmente árdua para *Salmonella* e pode levar à morte celular (Hill et al., 1995). Devido a esses recursos, o SBS demonstra o potencial de ser um antimicrobiano válido sobre outros ácidos orgânicos e inorgânicos, pois tem a capacidade de criar um ambiente altamente ácido que não é facilmente adaptável (Dittoe et al., 2019). Atualmente, o SBS é usado como um acidificante e ingrediente aniônico em uma ampla gama de produtos, incluindo alimentos para animais como ração para aves, suprimento de água para aves e como um acidificador no manejo de cama de aviário, laticínios e suínos (Sun et al., 2008; Calvo et al. 2010).

O bissulfato de sódio pode ser uma alternativa ao ácido peracético, pois demonstrou ser um antimicrobiano eficaz contra *Salmonella* em partes de frango (Dittoe et al., 2019).

## 3.8 Ácidos Orgânicos

### 3.8.1 Ácido Lático

O ácido lático ( $C_3H_6O_3$ ) é um ácido orgânico monocarboxílico produzido durante a respiração anóxica ou por fermentação por vários microrganismos bacterianos, incluindo bactérias ácido lácticas (LAB) (Axelsson, 1998). A atividade antimicrobiana do ácido lático é devido a sua penetração pela membrana citoplasmática, alterando o pH e interrompendo a força motriz do próton (Alakomi et al., 2001).

É geralmente reconhecido como seguro (*Generally Recognized As Safe - GRAS*) (21CFR184.1061), sendo assim permitido seu uso na adição direta em vários alimentos. Seu uso é aprovado pela FDA como antimicrobiano para aplicação em carcaças de animais (pré e pós-*chiller*; solução de ácido < 5%), cortes e aparas (2% a 3% de ácido, < 55 ° C) e em cabeças de bovinos e línguas (2,0-2,8% em sistemas de lavagem) (USDA-FSIS, 2010a). Não possui limite de ingestão diária aceitável em seres humanos (FAO, 1973). Seu uso na indústria de carne é amplo e muitos pesquisadores documentaram sua eficácia na redução de patógenos entéricos nas superfícies de carcaças e cortes derivados (Baird, et al 2006).

A descontaminação de carcaças de bovino com soluções de ácido lático em concentrações entre 2% e 5% é permitida na União Europeia desde 2013 (Official Journal of the European Union. Commission regulation (EU) No 101/2013). A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) concluiu que os tratamentos que utilizam ácido lático para a descontaminação da carne de porco não apresentam problemas de segurança, desde que a substância utilizada esteja em conformidade com as especificações da União para aditivos alimentares e seja eficaz para reduzir a contaminação microbiológica da superfície (EFSA. 2018). Porém, a descontaminação de carcaças de aves com ácido lático ainda não é permitida na União Europeia. Vários relatórios de pesquisa abordaram a eficácia do ácido lático na redução da contagem microbiana em carnes de aves (Burfoot & Mulvey, 2011; Chaine et al., 2013; Duan et al., 2017; Meredith et al., 2013; Mohamed & Abdel-Naeem, 2018; Moore et al., 2017; Okolocha & Ellerbroek, 2005; Ramezani et al., 2019).

### 3.8.2 Ácido Cítrico

O ácido cítrico é um ácido hidroxitricarboxílico ( $C_6H_8O_7$ ) encontrado naturalmente em todas as frutas cítricas. É solúvel em água, aprovado como GRAS (21CFR184.1033) para adição direta em vários alimentos e para uso na fabricação de carnes e aves frescas e processadas em concentrações específicas para sua finalidade (USDA-FSIS, 2010a). Devido às suas propriedades de baixa toxicidade não apresenta limite de ingestão diária para humanos. Em vista disso, tem uma grande demanda mundial para ser usado como antimicrobiano, intensificador de sabor, regulador de pH, agente espessante e reagente farmacêutico (Vargas, et al., 2016; Bizri & Wahem, 1994). Sua ação antimicrobiana é inibir as células através da quelação de metais.

No estudo de Tamblyn & Conner, (1997) o uso de ácido cítrico (4%) em um tanque *chiller* resultou em uma redução de 1,9 log/  $cm^2$  de pele em comparação com os controles para *S. Typhimurium*. O ácido cítrico e seus sais demonstraram eficácia no controle de patógenos em carnes frescas e processadas e em aves, mas seu uso é potencialmente limitado por um possível impacto sensorial negativo (concentração acima de 3%) e pela necessidade de manutenção de pH baixo para otimizar a atividade (Gonzalez-Fandos et al., 2020).

### 3.9 Ácido Fosfórico

O ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) é um ácido mineral usado em uma variedade de aplicações, incluindo produção de fertilizantes, fabricação de produtos químicos elevados, produtos farmacêuticos, detergentes, produção de alimentos, bebidas e tratamento de superfícies. Existem dois métodos de produção do ácido fosfórico: o úmido e o processo térmico. No processo úmido, o ácido sulfúrico é usado para digerir a rocha de fosfato de cálcio, produzindo uma pasta de sulfato de cálcio e ácido fosfórico, que é separado por 2 filtrações. O processo térmico consiste na queima do vapor de fósforo e no tratamento do óxido resultante com vapor.

O ácido fosfórico produzido pelo processo térmico é extremamente puro e pode ser usado em aplicações alimentares e técnicas. No entanto, esse processo requer grandes quantidades de energia e, conseqüentemente, um custo alto (Nasx et al., 2005).

Kemp et al. (2000) utilizou o cloreto de sódio acidificado (ASC) que foi ativado por ácido cítrico ou ácido fosfórico. Neste estudo, os autores investigaram vários parâmetros de tratamento para determinar condições para a atividade ASC contra microrganismos de ocorrência natural em carcaças de aves processadas. Verificou-se que o ácido fosfórico e o ácido cítrico são igualmente capazes de ativar o ASC para inativar aeróbios totais, *E. coli* e coliformes totais. O ácido fosfórico atuou principalmente como doador de prótons para permitir a acidificação do clorito de sódio.

### 3.10 Ultrassom

O ultrassom tem sido utilizado em indústria de alimentos para maximizar a qualidade, diminuir adição de compostos químicos e aumentar a segurança dos produtos alimentícios (Awad et al., 2012).

O ultrassom é definido como ondas de natureza mecânica que requerem um meio elástico para se propagar. A divisão mais conhecida de ultrassons é em baixa e alta intensidade (baixa e alta potência ou energia), e está diretamente relacionado às suas aplicações. O ultrassom de baixa energia (baixa potência, baixa intensidade) utiliza frequências superiores a 100 kHz em intensidades abaixo de  $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^2$ , que podem ser utilizadas para análise não invasiva e monitoramento de vários materiais alimentares durante o processamento e armazenamento para contribuir com a qualidade e segurança. Atualmente é utilizado em programas de melhoramento genético para animais e para avaliar a composição de produtos de carne crua e fermentada, peixes e aves. Também é usado para o controle de qualidade de frutas e legumes frescos na pré e pós-colheita, durante o processamento de queijos, óleos alimentares comerciais, produtos de pão e cereais, produtos alimentícios à base de gordura a granel e emulsionada, géis alimentares, alimentos gaseificados e congelados (Zhang et al., 2019).

O ultrassom de alta energia (alta potência, alta intensidade) usa intensidades superior a  $1 \text{ W} \cdot \text{cm}^2$  e frequências entre 20 e 500 kHz, induzindo efeitos sobre o meio físico, mecânico ou propriedades químicas/bioquímicas dos alimentos. Portanto, o objetivo da aplicação de ultrassons de alta intensidade é alterar o meio pelo qual as ondas se propagam. A maioria dos estudos de ultrassom de alta potência foi realizada em leite e produtos lácteos, além de ovos, arroz, soja, ervilhas e carne. Em carnes, o

ultrassom pode ser utilizado para auxiliar no amaciamento, acelerar a maturação e a transferência de massa, diminuir a energia de cozimento e aumentar o prazo de validade da carne, reduzindo populações microbianas sem afetar sua qualidade e características sensoriais (Piñon et al., 2019).

A eficácia antimicrobiana vai depender de fatores como frequência, intensidade e duração das ondas de ultrassom, características dos alimentos a serem tratados e tipo de microrganismo alvo (Joyce et al., 2011). As ondas de ultrassom produzem compressão e descompressão alternadas nos líquidos, o que leva à formação de bolhas de cavitação, que geram temperaturas e pressões locais muito altas quando crescem e colapsam repentinamente (Cárcel, et al., 2012). O colapso irregular de uma bolha de cavitação leva a um jato líquido acelerando através do centro da bolha produzindo ondas de choque de alta energia - o que pode causar danos à parede celular de bactérias (Chandrapala et al., 2012). Além disso, o efeito de altas temperaturas localizadas podem produzir radicais livres que podem causar lesão ao DNA e micro-fluxo que resultam no afinamento das membranas celulares, levando à perda da viabilidade celular (Bermúdez-Aguirre, et al., 2011). Portanto, o ultrassom pode aumentar a permeabilidade do sanitizante no tecido muscular e pode promover a redução bacteriana (Kassem et al., 2018), o que significa que uma combinação de ultrassom e antimicrobianos podem reduzir a contaminação bacteriana do folículo da pele de aves.

Lillard (1993) demonstrou que a utilização de ultrassom combinados com cloro (0,5 ppm) foi mais eficiente na redução de *S. Typhimurium* na pele do peito do frango, em comparação com um tratamento que utilizava apenas cloro. Após o ultrassom a 20 kHz durante 30 minutos, a redução microbiana foi de 1 - 1,5 log UFC/cm<sup>2</sup>, enquanto a redução microbiana para o tratamento com cloro foi de 1,0 log UFC/cm<sup>2</sup>. Contudo, após o tratamento com ultrassom + cloro (0,5 ppm), a redução de *Salmonella* foi de 2,5 - 4,0 log UFC/cm<sup>2</sup>, demonstrando o sinergismo entre os tratamentos combinados. Estudos propõem que tal efeito sinérgico se dá pela capacidade do ultrassom de destacar microrganismos das superfícies dos alimentos aumentando, assim o efeito de antimicrobianos (Leighton, 1994; Scouten e Beuchat, 2002; Seymour et al., 2002; Piyasena et al., 2003).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Culturas bacterianas

Cinco cepas de *Salmonella enterica* isoladas de carcaças de aves e surtos alimentares (strain SE86) no Brasil foram utilizadas nos ensaios: *S. Typhimurium* L12031, *S. Heidelberg* 22295, *S. Minnesota* 7301007, *S. Enteritidis* SE86 e *S. Saintpaul*. Todas as cepas pertencem ao acervo do Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos-ICTA / UFRGS (Brasil). No preparo do inóculo, cada cepa de *Salmonella* foi ativada em 10 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI) (HiMedia, Mumbai, Índia) por duas subculturas consecutivas, e cada subcultura foi incubada a 37 ° C por 24 h.

Para obtenção do inóculo, 10 mL de cada cultura ativada foram centrifugados a 3000 x g (Cientec, modelo CT-5000 R, São Paulo, Brasil) por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspenso em 9 ml de água peptonada 0,1% (m/ v HiMedia, Mumbai, Índia), e o processo foi repetido 3 vezes para cada cepa. Posteriormente, cada cepa foi ajustada para aproximadamente 8 log UFC/mL, utilizando espectrofotômetro (Ultrospec™ 3100 pro, GE Healthcare, Inglaterra), em comprimento de onda 630 nm, até atingir densidade óptica (DO) de 0,5.

Para preparação do coquetel, 2 mL de cada cepa previamente padronizada foram transferidas para um único tubo Falcon e adicionada água peptonada (0,1%) até atingir a densidade óptica de 8 log UFC/mL. Em seguida, através de diluição seriada, ajustou-se a concentração do coquetel para 6 log UFC/ml para utilização nos ensaios.

### 4.2 Preparação dos Antimicrobianos

As soluções de ácido peracético foram preparadas usando o agente higienizante à base de ácido peracético a ~ 14% e Peróxido de Hidrogênio a ~ 23% (Kalyclean S380, Kalykim, Brasil) diluído conforme as diretrizes do fabricante para produzir, de forma independente e combinada, as concentrações PAA 0,02/0,07/0,14% (v/v). As soluções de SBS (Pochteca, EUA), LA (Adidrol, Brasil), CA (Sigma, Acorich), PA (Delaware, Brasil) foram diluídas de forma independente e combinada em concentrações de 1 a 3% (m/v). Todas as soluções foram preparadas com água

destilada estéril (temperatura de  $\pm 8$  °C) em balão volumétrico nos dias dos ensaios para uso imediato. O pH foi medido usando um pHmetro de bancada (Modelo Q400A, Quimis, Brasil).

#### **4.3 Determinação da Concentração Inibitória (CIM)**

Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) do PAA, LA, CA, PA e SBS contra cada cepa individualmente ou reunidas em coquetel usando a metodologia proposta pelo Comitê de Normas Laboratoriais Clínicas (*CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008*) com pequenas modificações. Inicialmente 100  $\mu$ L de caldo Tryptic Soy (TSB, Sigma-Aldrich Saint Louis) estéril foram adicionados a cada poço em uma placa de 96 poços (TPPR, St. Louis, EUA). Em seguida, 100  $\mu$ L da solução a ser testada foram adicionados ao 1º poço; após homogeneização 100  $\mu$ L do primeiro poço foram transferidos para o segundo poço, do segundo poço para o terceiro e assim por diante para obter diluições sequenciadas. Em seguida, 100  $\mu$ L do inóculo (cepa ou coquetel) com concentração de 8 log UFC/mL foram adicionados a cada poço (linhas A, B, C, D, E, F, G e H). A penúltima coluna foi o controle positivo (sem adição dos antimicrobianos). Na última coluna não foi adicionado o inóculo sendo o controle negativo. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 h e posteriormente realizada leitura em espectrofotômetro de placas (Microplate Reader LMR-96; São Paulo, Brazil) com a função de mistura automática ativada medido em comprimento de onda de 630 nm. A MIC foi definida como a menor concentração de solução teste que inibiu a multiplicação dos microrganismos.

#### **4.4 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Para determinação da CBM utilizou-se a mesma metodologia descrita para CIM seguida pela inoculação de 20  $\mu$ L de cada diluição em placas contendo ágar desoxicolato-lisina-xilose XLD® (Merck, Darmstadt), as quais foram incubadas 37 °C, por 24 h. A concentração de desinfetante foi considerada bactericida se nenhum

crescimento foi detectado. Controle negativo (TSB) e positivo (TSB e *Salmonella*) foram feitos.

#### 4.5 Tratamentos e Contagem de *Salmonella* na pele de frango

Na primeira parte do projeto as amostras de pele de frango foram retiradas de carcaças resfriadas, adquiridas em supermercados locais com no máximo três dias da data de fabricação. Cada carcaça (peso médio de 2 kg) continha ~170 g de pele, que foram separadas em porções de 10 g cada e armazenadas em sacos estéreis.

Para reduzir a microbiota da pele de frango as amostras foram tratadas com luz UV (Sankyo UV, Brasil) a  $1.000 \mu\text{W s/cm}^2$  por 5 min e depois enxaguadas uma vez com água destilada estéril por 2 min. As peles foram contaminadas por aspersão na superfície com 1 mL do coquetel composto por 5 diferentes cepas de *Salmonella*, conforme descrito no item 4.1. Depois da contaminação artificial das superfícies das peles, os sacos plásticos foram massageados manualmente durante 2 minutos e, em seguida, fechados. Armazenou-se as amostras de pele durante 20 minutos a  $8^\circ\text{C}$  antes da realização dos tratamentos. Durante os tratamentos as amostras foram mergulhadas por 15 segundos, 5 minutos ou 30 minutos em 10 mL de diferentes soluções estéreis (m/v): ácido peracético PAA 0,02% (200 ppm), 0,07% (700 ppm) e 0,14% (1400 ppm) sozinho ou em combinação com ácido láctico (3% LA), ácido cítrico (3% CA), ácido fosfórico (1% PA) e sal bissulfato de sódio (2% SBS). O pH de todas as soluções foi medido no momento das análises de CIM e também do tratamento com as peles utilizando pHmetro de bancada (Modelo Q400A, Quimis, Brasil).

O tratamento com ultrassom (Model Eco-sonics, São Paulo, Brasil) foi realizado a 40 kHz e 500 W em dois diferentes tempos: 5 e 30 minutos. As amostras controles foram mergulhadas em água destilada estéril a  $10^\circ\text{C}$ . Os tratamentos químicos combinados com ultrassom foram 0,07% PAA e 0,14% PAA + 2% SBS por 5 e 30 minutos. Depois dos tratamentos, as peles de frango foram retiradas dos sacos plásticos e colocadas individualmente em frascos com 90 mL de neutralizante de água de peptona tamponada (nBPW, USDA FSIS 2016) para realização das contagens de *Salmonella*. A partir dessa suspensão foram realizadas diluições seriadas em água



peptonada 0,1%, semeadas alíquotas de 20 µL de cada diluição em meio seletivo para *Salmonella* (XLD® Merck, Darmstadt) e incubadas a 37 °C, durante 24 h.

A solução nBPW contém neutralizante tiosulfato de sódio para neutralização da ação do PAA.

#### **4.6 Recebimento e Preparação das carcaças de frango**

Foram utilizadas carcaças de frango resfriadas (n =114) provenientes da mesma indústria. As carcaças eram mantidas sob refrigeração desde a indústria até o momento da análise.

Todas as carcaças de frango foram divididas longitudinalmente em duas metades iguais. Cada amostra era composta por 2 metades, cada uma das metades foi codificada como “Amostra teste” e a outra a metade como “Amostra controle”. Esse procedimento foi realizado para garantir que a amostra controle e teste tivessem a mesma microbiota residente. Em seguida as 2 metades (testes e controle) foram inoculadas com o coquetel de *Salmonella* (concentração ~ 6 log UFC/mL, preparado conforme item 2.1) colocadas cada uma em um saco *Stomacher* (38 x 50 cm; Brazil) massageadas por 2 minutos e mantidas em refrigeração a  $4 \pm 2$  °C por 20 minutos antes dos tratamentos.

#### **4.7 Tratamentos Químicos das Carcaças**

Para cada amostra, (preparadas conforme item 4.6) foram realizados 4 ensaios, todos com tempo de tratamento da amostra com PAA de 15 segundos. Ensaio 1: tratamento por aspersão com 0,02% PAA, ensaio 2: tratamento por imersão com 0,02% PAA, ensaio 3: tratamento por imersão com 0,07% PAA e o ensaio 4: teste de contaminação cruzada. Ver item 4.10.

O tempo de exposição de 15 segundos foi determinado em ensaios preliminares, que demonstraram que tempos curtos possibilitam utilização de concentrações altas de antimicrobianos sem impactos negativos na coloração e textura na carne de frangos (Laranja et al., 2021).

#### 4.8 Tratamento com Aspersão

As amostras (n =30) foram suspensas por um gancho em um suporte móvel dentro de uma cabine de fluxo laminar. A metade teste foi aspergida com 0,02% PAA e a metade controle com água destilada estéril, ambas soluções mantidas em temperatura de  $4 \pm 2$  °C. A aspersão de 500 mL da solução teste foi realizada com um pulverizador com gatilho spray (210 kPa) em todas as direções durante 15 segundos. Após o tratamento as amostras foram individualmente colocadas em um saco *Stomacher* (38 cm 50 cm; Brazil) e adicionados 400 ml de nBPW (USDA FSIS 2016).

Em seguida os sacos contendo amostra e solução de nBPW foram colocadas no gelo e imediatamente retirada uma alíquota da solução e realizadas as diluições seriadas para contagem de microrganismo (conforme item 4.11).

#### 4.9 Tratamento por Imersão

As amostras (n =30) foram colocadas em sacos *Stomacher* (38 cm 50 cm; Brazil) e adicionado 1 L de solução 0,02% PAA nas amostras teste e nas amostras contendo a metade controle adicionou-se o mesmo volume de água destilada estéril, em temperatura de  $4 \pm 2$  °C. Após, cada amostra foi levada ao *shaker* (model SL180 SOLAB, Brazil) com velocidade de 4 rpm durante 15 segundos. Os parâmetros escolhidos para volume da solução e velocidade do *shaker* foram adaptados da metodologia proposta por Nagel et al. (2013).

Outras amostras (n =30) foram submetidas à mesma metodologia descrita anteriormente, porém utilizando a concentração de 0,07% PAA.

#### 4.10 Análise de Contaminação Cruzada

Amostras (n=24) foram divididas em 6 grupos com 4 carcaças cada: A, B, C e D. As carcaças foram cortadas e codificadas conforme descrito no item 4.6. Neste ensaio somente as amostras codificadas como Amostra A teste e Amostra A controle foram

inoculadas com coquetel de *Salmonella* (preparado conforme item 4.1). Em seguida a amostra A teste foi submetida à imersão em um saco contendo 1 L de 0,07% PAA (Enxague teste) e a Amostra A controle imersa em 1 L de água destilada estéril (Enxague controle) por 15 s. Em seguida estas metades foram retiradas e colocadas em saco *Stomacher* (38 cm 50 cm; Brazil) contendo 400 ml de nBPW (USDA FSIS 2016) e encaminhadas para análise de microrganismos (conforme item 4.11). Os sacos contendo as soluções enxague teste (Enxague T) e enxague controle (Enxague C) foram agitados por 1 minuto e retiradas alíquotas de 1 mL de cada um e colocadas em tubos individuais, contendo 9 mL de nBPW cada, para análise imediata das águas de enxague (conforme item 4.11). Os sacos foram agitados por 1 minuto e outra amostra de carcaça de frango (amostra B), desta vez sem inóculo, foi colocada em imersão por 15 segundos, a metade B teste no saco com o enxague T e a metade B controle no saco enxague C. Foram feitos os mesmos procedimentos para análise descrito anteriormente subsequente nas amostras C e D. As soluções utilizadas como enxague não foram trocadas durante todo o ensaio, ou seja, a solução 0,07% PAA ou a água destilada foi preparada somente uma vez e todas as amostras foram submergidas em sequência (15 segundos de tratamento cada), onde somente a primeira amostra (A) foi inoculada com *Salmonella* spp.

#### **4.11 Contagem de Microrganismos nas carcaças e na água de enxague**

Na segunda parte do projeto a contagem dos microrganismos foi feita pelo método convencional de cultura (Lee et al. 2015; Dias et al. 2016). Para a contagem dos microrganismos das carcaças retirou-se uma alíquota de 1 mL dos sacos contendo as amostras imersas em 400 ml nBPW. Foi então realizada a diluição seriada e inoculação em placas conforme o microrganismo a ser analisado.

Já para a contagem dos microrganismos presentes nas soluções de enxague (saco enxague T e saco enxague C) foram retiradas alíquotas de 1mL após o termino de cada tratamento das carcaças (15 segundos). Ou seja, após enxague da carcaça A (15 s), carcaça B (30 s), carcaça C (45 s), carcaça D (60 s) foi realizada a diluição seriada e inoculação em placas conforme o microrganismo a ser analisado.

Para contagem de *Salmonella*, foi utilizado o método de espalhamento em placas contendo o meio seletivo Xylose Lysine Deoxycholate Agar - XLD® (Merck, Darmstadt). As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios foi realizada pelo método de espalhamento em Plate Count Agar- PCA (Merck, Darmstadt) e incubadas a 30 °C por 48 h sobre condições aeróbicas. Para a contagem de *Enterobacteriaceae* e *E. coli* genérica o método utilizado foi *pour plate* em meio seletivo Violet Red Bile Agar w/ MUG -VRBA MUG (Himedia Ltda, India) e incubadas a 30 °C por 48 h. A contagem das colônias bacterianas fora convertidas para valores logarítmicos e relatadas como log UFC/mL.

#### 4.12 Atributos de Cor e Textura

Logo após o tratamento com os antimicrobianos a cor da pele do peito de frango sem o inóculo foi medida por leituras de refletância direta, de acordo com o sistema de coordenadas retangulares ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e Chroma na escala de cores CIELAB) em um colorímetro Konica Minolta® (modelo C-400, Osaka, Japan).  $L^*$  indica brilho e varia de preto ( $L^* = 0$ ) a branco ( $L^* = 100$ ),  $a^*$  indica a intensidade das cores vermelho (+) e verde (-) e  $b^*$  refere-se à intensidade do amarelo (+) e azul (-). Chroma e HUE representam a saturação e tonalidade, respectivamente. Esses parâmetros foram calculados usando as equações abaixo descritas:

$$C = \sqrt{a^2+b^2}$$

$$H = \tan^{-1} (b /a)$$

A análise do perfil de textura foi realizada, usando o analisador de textura TA-XT Plus (Stable Micro System, Surrey, Reino Unido). Uma placa de compressão de três polegadas de diâmetro foi instalada na célula de carga de 50 kg do analisador. Foi utilizado um cilindro de 2 mm para perfurar a pele. As velocidades de pré, pós e de teste foram 1 mm/s, 10 mm/s e 2 mm/s, respectivamente. As amostras foram perfuradas uma distância de 8 mm, ultrapassando a pele. A sonda de textura foi orientada perpendicularmente à pele e as medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

#### 4.13 Análises Estatísticas

Na primeira parte do projeto as contagens microbianas foram convertidas em log UFC/g. Para comparar diferenças significativas entre os tratamentos, foi utilizada ANOVA de 1 via, seguida pelos testes de comparação múltipla de Tukey com nível de significância ( $p < 0,05$ ). Os dados foram analisados usando o software IBM SPSS (IBM SPSS statistics 24 Software, Armonk, Nova York, Estados Unidos, [www.ibm.com](http://www.ibm.com)). Os dados sobre a caracterização da cor e textura da pele de frango foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA) e aplicando o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) usando SAS Studio online software. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Na segunda parte do projeto para comparar as diferenças significativas entre os tratamentos, foi utilizada ANOVA de 1 via, seguida dos testes de comparação múltipla de Tukey (para as carcaças) e Bonferroni (para a solução de enxague). A significância é determinada no nível de  $P < 0,05$ . Os dados foram analisados usando o software SAS (SAS, Institute Inc. Cary, NC, USA version 9.4 of the SAS system for windows). Todos os tratamentos foram feitos em triplicata.

## 5. ARTIGOS

Os resultados obtidos nesse trabalho estão apresentados em forma de Artigos científicos publicados ou a serem submetidos para publicação em revistas científicas internacionais.

**Artigo 1:** Antimicrobial Challenges Applied to the Broiler Processing: A Review. **A ser submetido em periódico.**

**Artigo 2:** *Salmonella* inactivation and changes on texture and color of chicken skin treated with antimicrobials and ultrasound.

**Publicado na revista científica** *Food Science and Technology*, V.149, 2021.

**Artigo 3:** Application of Peracetic Acid by Spray or Immersion in Chicken Carcasses to Reduce Cross-Contamination in the Slaughter Process.

**A ser submetido em periódico.**

## 6. DISCUSSÃO GERAL

A produção de carne de aves é uma das mais importantes do mundo, oferecendo produtos com proteínas de alta qualidade a preços de venda acessíveis para diversas culturas (Magdelaine, et al., 2008; OECD-FAO, 2020). Entretanto, a carne de frango pode estar contaminada por patógenos como *Salmonella* não tifoide e *Campylobacter* spp., representando risco à saúde pública (Rhouma et al. 2020).

Portanto, a indústria avícola tem grande interesse em estratégias de prevenção de patógenos e descontaminação no processamento da carne de frango para aumentar a segurança de seus produtos. Uma destas estratégias pode ser a aplicação de agentes antimicrobianos químicos em carcaças por aspersão ou imersão.

Neste estudo, primeiramente foi realizada uma revisão, artigo 1, sobre as principais rotas de contaminação por *Salmonella* e *Campylobacter* no processamento de aves e os principais agentes antibacterianos químicos com potencial para inibi-los. Os patógenos podem entrar na granja por várias fontes: por transmissão horizontal (ração, solo, ar, animais selvagens ou domésticos, humanos, caixas de transporte, microrganismos) ou vertical (contaminação do ovo pela galinha) (Xiao, et al., 2019; Hakeem, et al., 2021). Utilizando essas duas vias de transmissão, *Salmonella* e *Campylobacter* podem acometer todo o aviário rapidamente sem as aves aparentarem estar doentes (Stern et al., 2001), tornando-as reservatórios desses patógenos que poderão ser encontradas na pele, penas e intestino das aves (Yang, et al. 2002). Após o transporte para a indústria e durante o processamento as aves podem contaminar a carne por meio de contaminação cruzada (Xiao, et al., 2019; Hakeem, et al., 2021). Portanto, as aves podem ter esses patógenos naturalmente em diferentes quantidades, logo essa contaminação pode vir das granjas para a planta de processamento.

Nesse sentido, a redução da prevalência microrganismos nas granjas é essencial. Visto que a maioria das técnicas de descontaminação resulta em uma redução relativa, não eliminação de patógenos, dependendo diretamente do tipo e da extensão da contaminação inicial (Koutsoumanis, et al., 2006). Sendo assim, procedimentos que evitem a contaminação cruzada devem ser implementados dentro dos abatedouros-frigoríficos e a descontaminação de carcaças pode ser uma estratégia a mais que auxilie na redução de *Salmonella*, *Campylobacter* e outros

microrganismos presentes nas carcaças. Esse procedimento não deve ser utilizado como a principal ou única medida de redução de patógenos, mas deve ser utilizado em conjunto com rigorosas Boas Práticas de Fabricação e demais programas de autocontrole (Hugas & Tsigarida, 2008).

Outro ponto importante a ser considerado para adequada descontaminação de carcaças de frango é a indústria aviária. Naturalmente, a indústria aviária possui áreas mais contaminadas, como o matadouro-frigorífico para remoção de penas e evisceração, e outras menos contaminadas como o processamento da carne (Perez-Arnedo, et al., 2019). Uma das áreas menos contaminadas é a etapa de resfriamento por imersão, utilizada predominante nos Estados Unidos, o maior produtor mundial e no Brasil o maior exportador mundial de frango. A etapa de resfriamento é eficaz na redução da carga microbiana por causa do efeito de lavagem, mas com uma taxa aumentada de contaminação cruzada. A contaminação cruzada ocorre nessa etapa visto que o resfriamento aumenta a absorção de água pela carcaça. Sendo assim, caso uma das carcaças seja higienizada incorretamente, pode esta contaminar a água do tanque e as demais carcaças subsequentes. Portanto, através da absorção de água pela carcaça pode ocorrer a contaminação cruzada durante o processamento das peças.

Em vista disso, uma estratégia adotada por empresas de diferentes países para reduzir *Salmonella*, *Campylobacter* e outros microrganismos e controlar a contaminação cruzada é o uso de agentes antimicrobianos na água do resfriador (Loretz et al., 2010; Mckee, 2012; Nagel et al., 2013). Nos Estados Unidos, desde 1978, é permitida a lavagem das carcaças em substituição à remoção da contaminação por meio do corte (USDA, 1998), sendo aceita a adição de sanitizantes na água (USDHHS, 2010), o que atualmente não é legalmente permitido no Brasil (BRASIL, 1998).

Do mesmo modo, nos estados membros da UE, apenas a água potável é permitida para remover qualquer contaminação da superfície das carcaças, sendo reforçadas medidas para prevenir o extravasamento do conteúdo do trato digestivo (União Europeia, 2004). A lavagem com água é usada rotineiramente em fábricas de processamento de carne e tem se mostrado eficaz na remoção de contaminantes físicos / visíveis, como solo, penas e outros detritos (Hugas & Tsigarida, 2008). Porém, a eficácia do tratamento de água depende de diversos fatores operacionais:



temperatura da água, pressão, taxa de fluxo e distância da superfície alvo, método de aplicação, o tempo ou estágio de aplicação na sequência de abate e variação da planta (por exemplo, taxa de abate, tamanho e design da planta) (Gill & Badoni, 2004; Kiermeier, et al., 2006; Sofos & Smith, 1998). Além de fatores relacionados ao próprio produto (intrínsecos e implícitos), como lotes de animais, tipo de tecido cárneo, carga microbiana inicial, tipo de ecologia microbiana do produto e tempo de exposição à contaminação que pode afetar a fixação bacteriana e a formação de biofilme pode influenciar a eficácia dos tratamentos de descontaminação da água (Hugas & Tsigarida, 2008).

De acordo com Stefani et al. (2014), no Brasil, faltam pesquisas que avaliem a eficiência do uso de sanitizantes, em detrimento ao refile das partes contaminadas. Dessa maneira, não havendo consenso sobre o tema, a presente tese teve como objetivo avaliar a descontaminação de carcaças de frango por ácido peracético (PAA) isolado ou em combinação com outros antimicrobianos. O patógeno alvo selecionado para avaliar a descontaminação das carcaças foi *Salmonella*, pois é um dos principais agentes etiológicos identificados nas investigações de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil, desde 2000 (BRASIL, 2019) e tradicionalmente salmoneloses alimentares têm sido associadas ao consumo de aves (WHO/FAO, 2002; CDC, 2021).

No artigo 2 foi avaliado diferentes antimicrobianos químicos com potencial para inibir *Salmonella* em carcaças de frango. Além disso, foi escolhido um tratamento físico, o ultrassom, que poderia potencializar os efeitos antimicrobianos dos compostos químicos (Do Rosário et al., 2017; Duarte et al., 2018; Francisco et al., 2018). A descontaminação foi testada primeiramente na pele do frango (artigo 2) contra um coquetel de *Salmonella* e posteriormente (artigo 3) o melhor resultado foi testado em carcaças de frango. A partir da revisão (artigo 1) foram selecionados os antimicrobianos ácido peracético (PAA) e ácidos orgânicos, como ácido láctico (LA), ácido cítrico (CA) e ácido fosfórico (PA) e o bissulfato de sódio (SBS), pois todos são considerados GRAS, após aplicação não necessitariam de enxague e não prejudicam o ambiente. A escolha do ultrassom como provável potencializador se ocorreu porque foi constatado no artigo de revisão que os consumidores tem uma maior aceitabilidade em intervenções físicas que químicas.

Visando determinar a concentração de antimicrobiano a ser utilizada nas peles e possível efeito sinérgico iniciou-se a determinação de CIM e CBM. Os ensaios de CIM e CBM foram feitos contra diferentes sorovares de *Salmonella* individualmente e compondo um coquetel. Os resultados da CIM demonstraram que a concentração dos antimicrobianos necessária para inibir o crescimento do coquetel de *Salmonella* foi igual ou maior do que as concentrações necessárias para inibir cada cepa individualmente. A redução do efeito antimicrobiano contra o coquetel pode estar relacionada à variabilidade genética entre as diferentes cepas (Lianou & Koutsoumanis, 2013; Micciche et al., 2019). Corroborando essa possibilidade, foi testado o coquetel sem a cepa que havia sido identificada como a mais resistente no ensaio individual e os resultados do coquetel no CIM e no CBM não mudaram (resultados não mostrados). Esses resultados indicaram que as cepas poderiam se comportar de maneira diferente quando juntas ou separadas. Lianou e Koutsoumanis (2013) mostraram que 60 cepas de *Salmonella* apresentaram respostas diferentes quando expostas ao HCl em pH 3,0; no entanto, Nielsen e Knøchel (2020) mostraram que a taxa de inativação era mais dependente do tipo de ácido do que da cepa testada.

Os sinergismos observados nos resultados de CIM e CBM, entre PAA e os ácidos orgânicos, também podem ser causados pela acidificação do peróxido de hidrogênio, melhorando seus efeitos antimicrobianos (Briñez et al., 2006; Dittoe et al., 2019). Os valores de CIM e CBM demonstraram ser dependentes dos seguintes fatores: concentração e tipo de sanitizante usado, pH e o inóculo testado (cepa isolada ou coquetel).

A partir dos resultados obtidos no teste CBM foram feitos ensaios na pele do frango. No entanto, essas concentrações foram insuficientes para inibir o coquetel de *Salmonella* inoculado sobre a pele. Frequentemente, os resultados in vitro não são reproduzidos em matrizes alimentares devido à interferência de material orgânico. Tan, Lee & Dykes (2014) demonstraram que a pele pode atuar como barreira protetora, evitando que as soluções antimicrobianas entrem em contato com os microrganismos. Portanto, foram testadas concentrações mais altas dos antimicrobianos. A concentração de PAA foi duplicada (0,14%) e as soluções associadas foram ajustadas para 0,14% PAA + 2% SBS, 0,07% PAA + 3% CA e 0,07% PAA + 3% CA, e SBS para 2%.

Entre o tratamento combinado, 0,14% PAA + 2% SBS apresentou a maior redução microbiana (2,8 log UFC/g). Esse efeito bactericida potencializado da associação PAA + SBS pode ser devido à redução do pH, causando a ruptura do gradiente de prótons, levando à morte celular (Kim et al., 2005). Dittoe et al. (2019) avaliaram a combinação de 0,02% PAA + 3% SBS e obtiveram uma redução acima de 1,7 log UFC / g de *S. Enteritidis* em coxas de frango.

O uso de antimicrobianos em alimentos depende das propriedades dos compostos como fórmula química, forma física, valor de pKa, peso molecular, concentração inibitória mínima, natureza do microrganismo, propriedades tampão do alimento, método de aplicação (spray ou imersão), tempo e temperatura exposição (Coban, 2020; Gonzalez-Fandos et al., 2020; Davidson et al., 2005; Thompson & Hinton, 1997). Com o objetivo de potencializar os efeitos antimicrobianos dos antimicrobianos PAA e SBS, avaliou-se o efeito combinado dos ácidos com o ultrassom, considerando que as maiores reduções microbianas ocorreram quando a pele do frango foi imersa por 30 minutos em 0,14% PAA + 2% SBS + US (3,00 log UFC / g) e 0,07% PAA + 2% SBS + US (2,70 log UFC / g). Entretanto, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas reduções microbianas ao usar US combinado com sanitizantes (0,07% PAA) 2,50 log UFC /g e 0,14% PAA 2,80 log UFC /g). O uso de ultrassom pode ser eficaz na fase de pré-*chiller* do processamento de aves, destacando frouxamente e células aderidas intermediárias de carcaças de frango. Depois disso, os desinfetantes podem ser usados em tanques de resfriadores, que geralmente podem conter menos matéria orgânica e, conseqüentemente, menos interferência na ação do desinfetante.

A partir dos resultados com a pele do frango foram feitas análises de cor e textura. A cor e textura são os indicadores de qualidade mais importantes para a carne de frango, uma vez que a aparência afeta a escolha do consumidor e / ou o preço do produto (Fletcher, 2002; Petracci, 2004). Resultados obtidos nos ensaios indicaram alterações visíveis na cor da pele do frango nas concentrações de 0,14% de PAA sozinho e 0,07% de PAA combinado com CA e LA. Já o tratamento com PAA 0,07% e 2% SBS não causou alteração de cor visível. Considerando que um sanitizante ideal deve ser de alta eficácia em pouco tempo e em baixas concentrações, não deve afetar a qualidade ou as características sensoriais do alimento, ser estável, não cancerígeno e apresentar baixo custo, foi escolhido a combinação de menor tempo

(15 segundos) e concentração (0,07% PAA) o qual não causou alterações na textura e na cor da pele para ser testada em carcaças de frango.

Primeiramente, foi avaliado a eficácia de 0.02% PAA aplicado por aspersão ou imersão para inativar um coquetel de *Salmonella* spp. inoculado artificialmente e microrganismos naturalmente presentes em carcaças de frango na etapa de resfriamento (Máximo 0,02%). Essa dosagem foi escolhida por ser a máxima utilizada em um tanque resfriador. Se preconizou primeiro a possibilidade de se utilizar o PAA em tanque resfriador (tempo médio de 30 minutos) devido ao menor custo e facilidade de implementação. Visto que o PAA nos EUA também é utilizado no tanque de *chiller* (Vaddu, et al. 2021).

Porém, a concentração de 0,02% PAA em 30 min (tempo médio de um resfriador) alterou a coloração da carcaça. Em vista disso, se escolheu o tempo de 15 segundos (*pós-chiller*) para a comparação entre os métodos de aplicação. Na etapa *pós-chiller* o tempo de tratamento é mais curto, o volume de água é menor, as concentrações de sanitizantes podem ser mais altas (máximo 0,2% PAA) e pode haver menor carga orgânica. Os resultados deste ensaio mostraram que a imersão das carcaças em PAA foi mais eficiente para reduzir os microrganismos avaliados em comparação a aspersão. Nos tratamentos de imersão (0,02% PAA) as maiores reduções foram determinadas para mesófilos aeróbios (0,98 log UFC/mL), *Enterobacteriaceae* (0,93 log UFC/mL) e *Salmonella* (0,84 log UFC/mL), sem diferenças significativas ( $P > 0.05$ ) entre os 3 microrganismos. Bauermeister et al. (2008) relataram uma redução de *Salmonella* de 1,29 log UFC /ml após 1 h de imersão em 0,02% PAA, porém as carcaças apresentaram uma cor mais clara do que controle. Resultados de redução similares foram obtidos por Nagel et al. (2013), entretanto, não foram detectadas modificações sensoriais das amostras analisadas, possivelmente devido ao tempo curto de tratamento (20 s) com concentração de 0.04% e 0.1% PAA. Os resultados do presente estudo, embora em escala laboratorial, são similares aos encontrados nos estudos de Kemp et al. (2000), Okolocha et al (2005), Burfoot et al, (2011) conduzidos em plantas industriais, os quais mostraram que tratamentos com antimicrobianos em carcaças de frango utilizando o método de imersão provocam maior redução na contagem microbiana do que o método aspersão. Possivelmente no método de imersão ocorre maior contato dos antimicrobianos com a superfície da carcaça, levando a uma maior eficiência do tratamento (Kemp et al., 2000). Baseando-

se nestes resultados, para os próximos ensaios optou-se pela técnica de imersão com 0.07% PAA, concentração determinada em estudos anteriores como a mais adequada para reduzir o número de microrganismos sem alterar a qualidade das carcaças. Resultados demonstraram que as carcaças tratadas por imersão com 0.07% PAA por 15s obtiveram redução ~ 2,0 log UFC/mL de *Salmonella* e mesófilos aeróbios, bem como ~ 1,5 log UFC/mL de *Enterobacteriaceae* e *E. coli* sugerindo ser uma possível barreira adicional para reduzir a contaminação microbiana durante o processamento de frangos. Porém, a utilização de um tanque pós-*chiller* poderia ocasionar contaminação cruzada entre as carcaças. Portanto, foi investigado se a utilização de 0,07% de PAA na água de enxague seria eficiente para evitar contaminação cruzada entre carcaças de frango.

Em nosso estudo obtivemos reduções ~ 2 log UFC/mL e durante todo o tempo de experimento não foi possível detectar nenhum dos microrganismos testados na solução teste de enxague, sugerindo que a concentração utilizada de 0,07% PAA foi eficiente para impedir a sobrevivência destes microrganismos nesta solução. Isso confirma que o enxague nas carcaças pós-*chiller* com PAA 0,07% é eficiente para evitar a contaminação cruzada entre carcaças e reduzir a contagem de microrganismos e possivelmente aumentando o tempo de vida útil dos produtos.

Entretanto, conforme os pareceres do Comité Científico da Veterinária Medidas relativas à Saúde Pública (SCVPH, 1998, 2003) os tratamentos de descontaminação devem ser considerados como meio suplementares de redução da carga microbiana de alimentos de origem animal e devem fazer parte de um programa de controle integrado em toda a cadeia alimentar. Contudo, demais experimentos são necessários para validar esses resultados em nível industrial. Além disso, estes devem se basear na avaliação de risco considerando vários fatores como: a segurança e a eficácia das substâncias do ponto de vista da saúde pública (químico e avaliação de risco microbiológico, respectivamente); a avaliação de risco ocupacional; o impacto no meio ambiente; a aceitabilidade e qualidade do produto (por exemplo, aparência, sabor); a percepção do consumidor, o interesse industrial e a análise de custo-benefício (Hugas & Tsigarida, 2008). Além do mais, é importante analisar a estabilidade da formulação de PAA na planta de processamento (Vaddu, et al 2021). A análise dos componentes da fórmula comercial e o tempo de estabilidade também são fatores importantes a

serem considerados para uma possível aplicação do PAA como descontaminante em carcaças de frango. Neste contexto, a utilização de um tanque de imersão pós-resfriamento contendo 0,07% PAA pode ser uma alternativa eficaz junto com as boas práticas de higiene para melhorar a qualidade microbiológica de carcaças de frango e evitar a contaminação cruzada entre carcaças.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que:

- Os ensaios de CIM / CBM sugeriram sinergia no efeito antimicrobiano quando o PAA foi combinado com ácidos orgânicos (LA, CA e PA ) ou SBS.
- As concentrações determinadas no teste de CBM para inibir o coquetel de *Salmonella* foram maiores ou iguais às concentrações usadas para inibir as cepas individuais, indicando que o coquetel de *Salmonella* foi mais resistente aos antimicrobianos do que os sorovares isolados.
- Os tratamentos com 0,07 a 0,14% PAA reduziram ~ 2,0 a 2,59 log UFC/g de *Salmonella* nas peles de frango submersas por 15 segundos.
- Os tratamentos com 0,14% de PAA causaram modificações visíveis na cor da pele do frango, prejudicando aspectos de qualidade.
- O tratamento com o ultrassom não aumentou os efeitos antimicrobianos do PAA isolado e combinado.
- A imersão da pele do frango por 15 segundos em 0,07% de PAA foi o melhor tratamento testado, visto que reduziu significativamente o coquetel de *Salmonella* na pele do frango (2,08 log UFC/g), sem causar alteração na cor e textura.
- PAA foi mais eficiente para reduzir microrganismos presentes nas carcaças de frango quando aplicados por imersão do que por aspersão.
- O tratamento das carcaças por imersão em 0,07% de PAA por 15 segundos, reduziu ~ 2,0 log UFC/mL de *Salmonella* e mesófilos aeróbios, bem como ~ 1,5 log UFC/mL de *Enterobacteriaceae* e *E. coli*, sugerindo ser uma barreira adicional para reduzir a contaminação microbiana de carcaças de frango.
- A adição de 0,07% de PAA na água de enxague utilizada para imersão de carcaças pode prevenir a contaminação cruzada entre elas, sendo que mais estudos são necessários para avaliar essa possibilidade em escala industrial.
- O uso de 0,07% PAA por imersão de carcaças em conjunto com Boas Práticas Higiênicas pode contribuir para aumentar a segurança e o *shelf-life* de carcaças de frango.

## 8. REFERÊNCIAS

- Alakomi, H. L., E. Skytta, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, and M. I. Helander. (2001). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied Environmental Microbiology*. 66:2001–2005.
- Awad, T. S., Moharram, H. A., Shaltout, O. E., Asker, D., & Youssef, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48(2), 410–427.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.05.004>
- Axelsson, L. T. (1998). Lactic acid bacteria. In S. Salminen, & A. Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria* (pp. 1–63). New York, NY: Marcel Dekker, Inc.
- Baird, B. E., Lucia, L. M., Acuff, G. R., Harris, K. B., & Savell, J. W. (2006). Beef hide antimicrobial interventions as a means of reducing bacterial contamination. *Meat Science*, 73, 245–248.
- Bautista, D.A., Sylvester, N., Barbut, S., and Griffiths, M.W. (1997). The determination of efficacy of antimicrobial rinses on turkey carcasses using response surface designs. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 279.
- Belluco, S., Barco, L., Roccato, A., & Ricci, A. (2016). *Escherichia coli* and *Enterobacteriaceae* counts on poultry carcasses along the slaughterline: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*, 60, 269–280. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.07.033>> Acesso em: 30 maio 2019.
- Berrang, M. E., & Dickens, J. A. (2000). Presence and level of *Campylobacter spp.* on broiler carcasses throughout the processing plant. *Journal of Applied Poultry Research*, 9(1), 43 e 47.
- Bizri JN, Wahem IA (1994) Citric acid and antimicrobials affect microbiological stability and quality of tomato juice. *J Food Sci* 59(1):130–134
- Blankenship, L. C., B. G. Lyon, A. D. Whittemore, and C. E. Lyon. (1990). Efficacy of acid treatment plus freezing to destroy *Salmonella* contaminants of spice-coated chicken fajita meat. *Poult. Sci.* 69 (Suppl. 1):20. (Abstract.)
- Brasil. (1997a). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Circular no 272 de 22 de dezembro de 1997. Implantação do programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO). Brasília, 1997. Disponível em: <<https://www.cn3.com.br/wp->



content/uploads/2016/04/Circular-N%C2%BA272-de-22-de-dezembro-de-1997.pdf>

Acesso em: 15 dez. 2019.

Brasil. (1997b). Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria no. 368 de 4 de setembro de 1997. Aprovar o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos. Brasília. 1997. Disponível em:<<http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/bra150035.pdf>>

Brasil. (1998). Ministério da agricultura e do Abastecimento; Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico sanitária de Carne de aves. Portaria n° 210, de 10 de novembro de 1998. Disponível em:< <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1129>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

Brasil. (2006). Ministério da Agricultura. Circular no. 668. Diretrizes para preparação de plano de APPCC (HACCP) para o processo de abate de aves. Brasília. 2006.

Brazil. (2011a). Ministry of Agriculture. Nota Técnica. Avaliação da utilização do sistema de lavagem de carcaças para a remoção da contaminação por conteúdo gastrointestinal visível. Brasília..

Burfoot, D., & Mulvey, E. (2011). Reducing microbial counts on chicken and turkey carcasses using lactic acid. *Food Control*, 22(11), 1729–1735. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.04.005>

Byrd, J.A., McKee, S.R. (2005). Improving slaughter and processing technologies. In: Mead, G.C. (Ed.), *Food Safety Control in the Poultry Industry*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, pp. 310–327.

Callaway, T., T. Edrington, R. Anderson, J. Byrd, and D. Nisbet. (2008). Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. *J. Anim. Sci.* 86:E163–E172.

Calvo, M.S.; Gerry, A.C.; McGarvey, J.A. (2010). Armitage, T.L.; Mitloehner, F.M. Acidification of calf bedding reduces fly development and bacterial abundance. *J. Dairy Sci.* 93(3), 1059–1064.

Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V., Benedito, J., & Mulet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 200–207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.038>.

- Cason, J. A., M. E. Berrang, R. J. Buhr, and N. A. Cox. (2004). Effect of prechill fecal contamination on the number of bacteria recovered from broiler chicken carcasses before and after immersion chilling. *J. Food Prot.* 67:1829–1833.
- Chaine, A., Arnaud, E., Kondjoyan, A., Collignan, A., & Sarter, S. (2013). Effect of steam and lactic acid treatments on the survival of *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* inoculated on chicken skin. *International Journal of Food Microbiology*, 162(3), 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.012>
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing - Food quality assurance and food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 26(2), 88–98.  
Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.010> > Acesso em: 15 maio 2019
- Chen, X., Bauermeister, L. J., Hill, G. N., Singh, M., Bilgili, S. F., & McKee, S. R. (2014). Efficacy of various antimicrobials on reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* and quality attributes of ground chicken obtained from poultry parts treated in a postchill decontamination tank. *Journal of Food Protection*, 77(11), 1882–1888. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-114>.
- Costalunga, S. & Tondo, E.C.,(2002) Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 33, p. 342-346.
- Cox, N. A., Richardson, L. J., Cason, J. A., Buhr, R. J., Vizzier-Thaxton, Y., Smith, D. P., et al. (2010). Comparison of neck skin excision and whole carcass rinse sampling methods for microbiological evaluation of broiler carcasses before and after immersion chilling. *Journal of Food Protection*, 73(5), 976e980.
- del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2007). Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 268–280. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.048>
- Dittoe, D. K., Atchley, J. A., Feye, K. M., Lee, J. A., Knueven, C. J., & Ricke, S. C. (2019). The efficacy of sodium bisulfate salt (SBS) alone and combined with peracetic acid (PAA) as an antimicrobial on whole chicken drumsticks artificially inoculated with *Salmonella* Enteritidis. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JAN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00006>

- Duan, D., Wang, H., Xue, S., Li, M., & Xu, X. (2017). Application of disinfectant sprays after chilling to reduce the initial microbial load and extend the shelf-life of chilled chicken carcasses. *Food Control*, 75, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.017>
- Dufour, E.; Renou, J. P. (2002) Propriétés structurantes de l'eau dans les produits à structure cellulaire. muscle, viande et produits carnés. In: Le Meste, M.; Lorient, D.; Simatos, D. (Eds.). *Propriétés de l'eau dans les aliments*. Lavoisier: Tec & Doc. p. 159-188.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2005). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. *The EFSA Journal*, 297, 1 e 27.
- Escudero-Gilete, M. L., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2005). Multivariate study of the decontamination process as function of time, pressure and quantity of water used in washing stage after evisceration in poultry meat production. *Journal of Food Engineering*, 69(2), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.08.015>
- Fletcher, D. L., Russel, S. M., & Walker, J. M. (1993). An evaluation of a rinse procedure using sodium bicarbonate and hydrogen peroxide on the recovery of bacteria from broiler carcasses. *Poultry Science*, 72, 2152–2156.
- Food and Agriculture Organization (1973). Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications. 17th Report of the Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Series No. 539. FAO Nutrition Meetings Report Series No. 53.
- Franchin, P. R., M. D. Batistella, and C. R. Vieira. (2010). Evaluation of multi-sequential interventions with water to reduce microbial loading as applied to chicken carcasses during slaughtering – a review. *Poult. Sci.* 66:203–214.
- FVE (2005). Public Health. Implementing measures of the hygiene package. May Newsletter. Federation of Veterinarians of Europe, Brussels, pp. 4–6.
- Gombas, D., Luo, Y., Brennan, J., Shergill, G., Petran, R., Walsh, R., et al. (2017). Guidelines to validate control of cross-contamination during washing of fresh-cut leafy vegetables. *Journal of Food Protection*, 80(2), 312–330. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16 258>.

- Gonzalez-Fandos, E., Maya, N., Martínez-Laorden, A., & Perez-Arnedo, I. (2020). Efficacy of lactic acid and modified atmosphere packaging against *Campylobacter jejuni* on chicken during refrigerated storage. *Foods*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.3390/foods9010109>
- Gorman, B.M., Sofos, J.N., Morgan, J.B., Schmidt, G.R., and Smith, G.C. 1995. Evaluation of hand-trimming, various sanitizing agents, and hot water spray as decontamination treatments for beef brisket adipose tissue. *J. Food Prot.* 58, 899.
- Graves Delmore, L.R., Sofos, J.N., Reagan, J.O., Smith, G.C., (1997). Hot water rinsing and trimming/washing of beef carcasses to reduce physical and microbiological contamination. *J. Food Sci.* 61, 373–376.
- Hannemann, S. & Galán, G. (2017). *Salmonella* Enterica serovar-specific transcriptional reprogramming of infected cells. *PLOS Pathogens*, San Francisco, v. 13, n. 7, p. 1-17.
- Hofer, E.; Silva Filho, S. J. da; Reis, E. M. F. (1997). Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 17; n. 2; p. 55-62.
- Hill, C., O'Driscoll, B., & Booth, I. (1995). Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 245–254. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00060-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00060-7)
- Hinton, A., Cason, J. A., & Ingram, K. D. (2004). Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2), 155–165. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00377-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00377-5)
- Hugas, M., Tsigarida, E., (2008). Pros and cons of carcass decontamination: the role of the European Food Safety Authority. *Meat Science* 78, 43–52.
- Hwang, C., and Beuchat, L.R. (1995). Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. *J. Food Prot.* 58, 19.
- James, C., Vincent, C., de Andrade Lima, T. I., & James, S. J. (2006). The primary chilling of poultry carcasses-a review. *International Journal of Refrigeration*, 29(6), 847–862. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2005.08.003>
- Joyce, E., Al-Hashimi, A., & Mason, T. J. (2011). Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 862–870. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04923.x>

- Kemp, G. K., Aldrich, M. L., & Waldroup, A. L. (2000). Acidified sodium chlorite antimicrobial treatment of broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, 63(8), 1087–1092. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.8.1087>
- Kochevar, S.L., Sofos, J.N., Bolin, R.R., Reagan, J.O., and Smith, G.C. (1997). Steam vacuuming as a preevisceration intervention to decontaminate beef carcasses. *J. Food Prot.* 60, 107.
- Knueven CJ.(1999) Sodium Bisulfate as Acidulant in Foods. U.S. Patent No 5,958,491. Washington, DC: Patent US, and Trademark Office (1999).
- Li, Y.; Slavik, M.F.; Walker, J.T.; Xiong, H.(1997) Pre-chill of chicken carcasses to reduce *Salmonella* Typhimurium. *J. Food Sci.* 1997, 62(3), 605–607.
- McKee, S. (2012). *Salmonella* control in Poultry. *Salmonella* Control in Poultry Processing, In: Proceedings of the American Meat Science Association 65th Annual Reciprocal Meat Conference. Fargo, SD: North Dakota State University Fargo. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00481>
- Meredith, H., McDowell, D., & Bolton, D. J. (2013). An evaluation of trisodium phosphate, citric acid and lactic acid cloacal wash treatments to reduce *Campylobacter*, total viable counts (TVC) and total *Enterobacteriaceae* counts (TEC) on broiler carcasses during processing. *Food Control*, 32(1), 149–152. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.026>
- Mion, L. et al. (2014) Perfil de resistência a antimicrobianos por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 a 2009. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 42:1197.
- Mohamed, H. M. H., & Abdel-Naeem, H. H. S. (2018). Enhancing the bactericidal efficacy of lactic acid against *Salmonella* typhimurium attached to chicken skin by sodium dodecyl sulphate addition. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 464–469. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.022>
- Moore, A., Nannapaneni, R., Kiess, A., & Sharma, C. S. (2017). Evaluation of USDA approved antimicrobials on the reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* in ground chicken frames and their effect on meat quality. *Poultry Science*, 96(7), 2385–2392. <https://doi.org/10.3382/ps/pew497>
- Nagel, G. M., Bauermeister, L. J., Bratcher, C. L., Singh, M., & McKee, S. R. (2013). *Salmonella* and *Campylobacter* reduction and quality characteristics of poultry carcasses treated with various antimicrobials in a post-chill immersion tank.

International Journal of Food Microbiology, 165(3), 281–286.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.016>

OJEC (2004). Regulation (EC) No. 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific Hygiene rules for the hygiene of foodstuffs. Official Journal of European Communities L139/55 (30.4.2004. Disponível em: <<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:EN:PDF>> Acesso em: 27 set 2019.

OJEU (2009). Council Decision 2009/121/EC of 18 December 2008 rejecting the proposal from the Commission for a Council Regulation implementing Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the use of antimicrobial substances to remove surface contamination from poultry carcasses. Official Journal of the European Union L42/13 Disponível em: < <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:042:0013:0015:EN:PDF>> Acesso em: 27 ago 2019.

Okolocha, E. C., & Ellerbroek, L. (2005). The influence of acid and alkaline treatments on pathogens and the shelf life of poultry meat. Food Control, 16(3), 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.01.015>

Piñon, M., Alarcon-Rojo, A., Paniwnyk, L., Mason, T., Luna, L., & Renteria, A. (2019). Ultrasound for improving the preservation of chicken meat. Food Science and Technology, 39(June), 129–135. <https://doi.org/10.1590/fst.39017>

Pulido-Landínez, M.; Sánchez-Inguza, R.; Nascimento, V.P. do. (2013) Assignment of serotype to *Salmonella* Enterica isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. Letters in Applied Microbiology, v. 57, p. 288-294.

Purnell, G., James, C., James, S. J., Howell, M., & Corry, J. E. L. (2013). Comparison of acidified sodium chlorite, chlorine dioxide, peroxyacetic acid and tri-sodium phosphate spray washes for decontamination of chicken carcasses. Food & Bioprocess Technology, 7(7), 2093e2101.

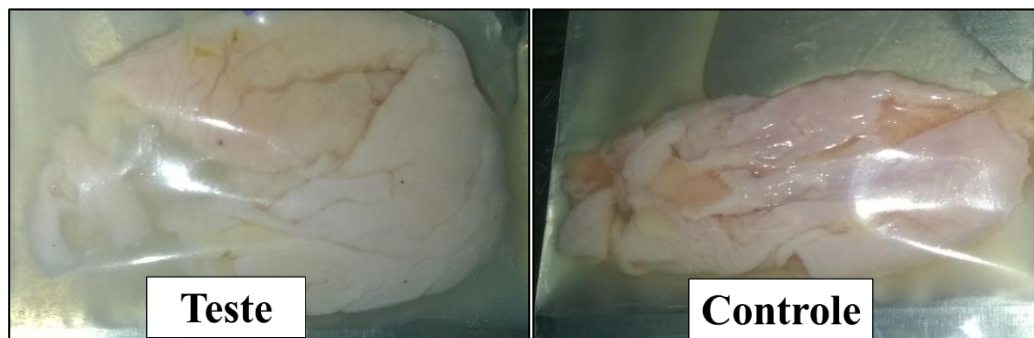
Ramezani, F., Najafi, M. A., Rahnema, M., & Haddadi, T. (2019). Separate and combined effects of lactic acid, chitosan and modified atmosphere packaging on the shelf life of quail carcass under chilled conditions. International Journal of Food Microbiology, 289(April 2018), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.011>

- Rodriguez de Ledesma, A.M., Riemann, H.P., and Farver, T.B. (1996). Shorttime treatment with alkali and/or hot water to remove common pathogenic and spoilage bacteria from chicken wing skin. *J. Food Prot.* 59, 746.
- Sanchez, M. X., Fluckey, W. M., Brashears, M. M., & McKee, S. R. (2002). Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter spp.* and *Salmonella spp.* in broilers processed in air-chilled and immersion-chilled environments. *Journal of Food Protection*, 65(6), 948 e 956.
- Savell, J. W., Mueller, S. L., & Baird, B. E. (2005). The chilling of carcasses. *Meat Science*, 70 (3 SPEC. ISS.), 449–459. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.06.027>
- Smooth, L., & Pierson, M. (1997). Indicator microorganisms and microbiological criteria. In *Food microbiology fundamentals and frontiers* pp. 66 e 80. ASM Press.
- Somers, E.B., Schoeni, J.L., Wong, C.L., (1994). Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology* 22, 269–276.
- Sun, H.; Pan, Y.; Zhao, Y.; Jackson, W.A.; Nuckles, L.M.; Malkina, I. L.; Arteaga, V.E.; Mitloehner, F.M. (2008). Effects of sodium bisulfate on alcohol, amine, and ammonia emissions from dairy slurry. *J. Environ. Qual.* 37(2), 608–614.
- Tamblyn KC, Conner D.E. (1997) Bactericidal activity of organic acids in combination with transdermal compounds against *Salmonella* typhimurium attached to broiler skin. *Food Microbiol* 14:477–484. <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0112>
- USDA-FSIS. (2011a). and Suitable Ingredients Used in the Production of Meat, Poultry, and Egg Products. FSIS Directive 7120.1 Revision 9. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/7120.1Amend21.pdf>> Acesso em: 11 set 2019.
- USDA-FSIS (2010a). Safe and suitable ingredients used in the production of meat and poultry products. Directive 7120.1, Rev. 2. Disponível em: <[www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/7120.1Rev2.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/7120.1Rev2.pdf)> Acesso em: 27 maio 2019.
- Vargas C (2016) Organic acids: characteristics, properties and synthesis. *Biochemistry research trends*. Nova Science Publishers, Hauppauge
- Waldroup, A.L., (1996). Contamination of raw poultry with pathogens. *World Poultry Science Journal* 52, 7–25 (84, 87, 90, 93).

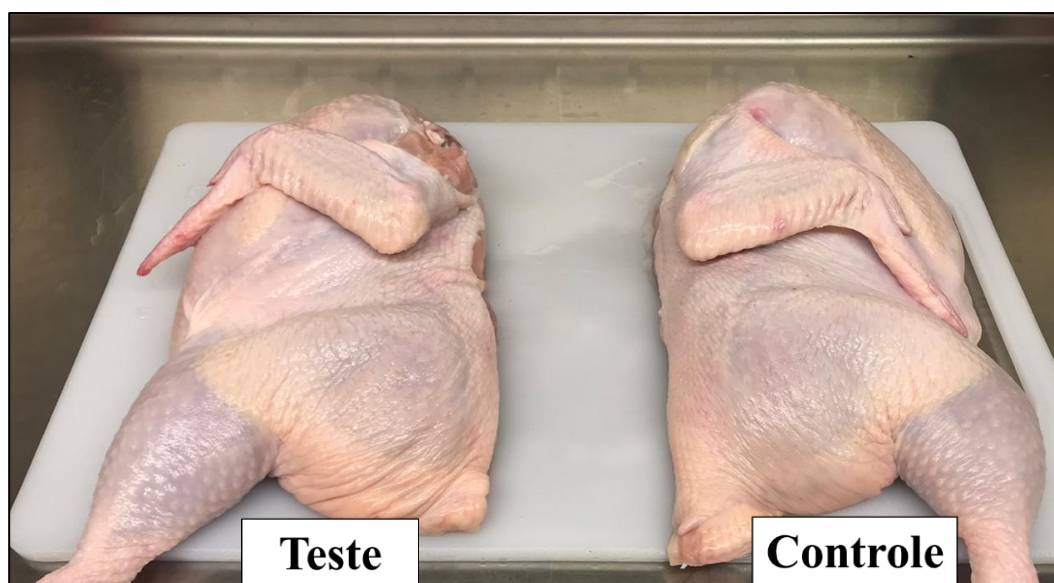
- Whyte, P., Collins, J. D., McGill, K., Monahan, C., & O'Mahony, H. (2001). Quantitative investigation of the effects of chemical decontamination procedures on the microbiological status of broiler carcasses during processing. *Journal of Food Protection*, 64(2), 179e183.
- Whyte, P., Mc Gill, K., & Collins, J. D. (2004). Erratum: An assessment of steam pasteurization and hot water immersion treatments for the microbiological decontamination of broiler carcasses (*Food Microbiology* (2003) 20 (111-117)). *Food Microbiology*, 21(2), 247. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.12.001>
- Zhang, Z. H., Wang, L. H., Zeng, X. A., Han, Z., & Brennan, C. S. (2019). Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(1), 1–13. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13903>



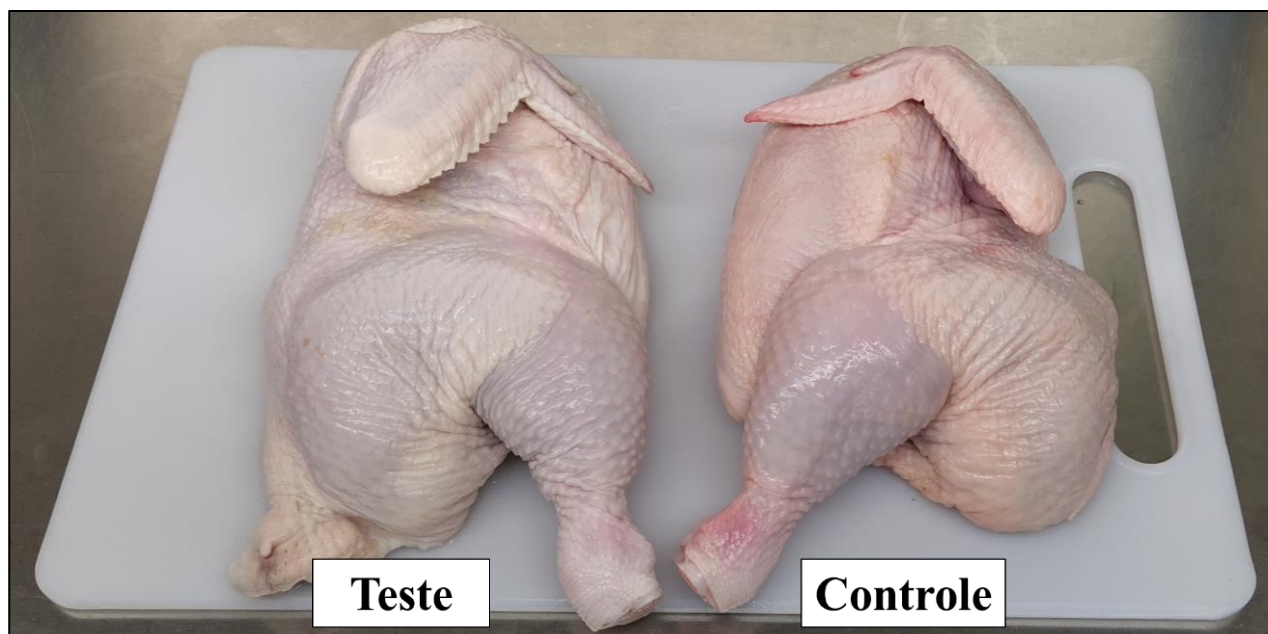
## 9. APÊNDICES



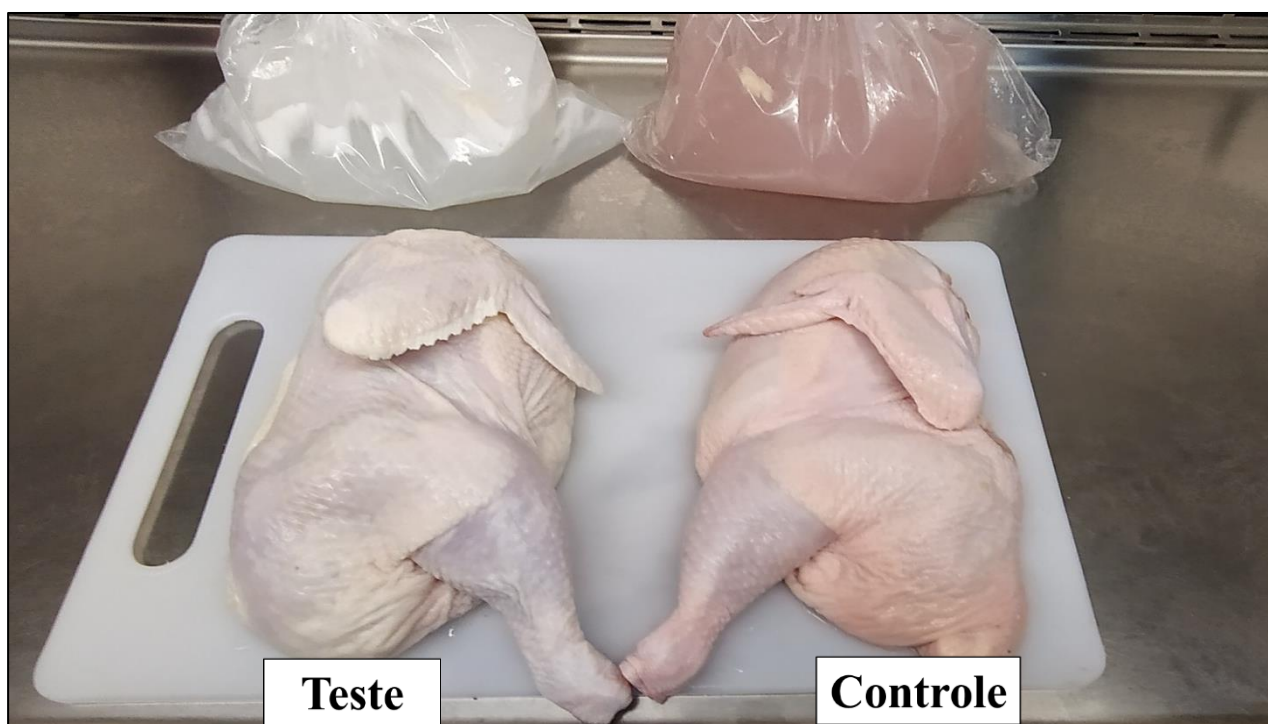
**Figura 1:** Tratamento pele de frango com 0,07% PAA por 30 minutos.



**Figura 2:** Tratamento com 0,07% PAA por 15 segundos.



**Figura 3:** Tratamento com 0,02% PAA por 30 minutos.



**Figura 4:** Tratamento com 0,07% PAA por 30 minutos.