

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

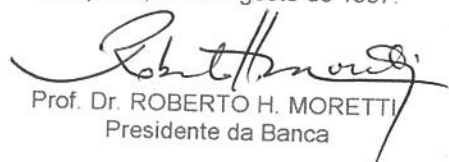
**CARNE DE FRANGO REFRIGERADA :
AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO DIMETILDICARBONATO
NA VIDA-DE-PRATELEIRA**

Tese de Doutorado

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por MARIA DA PENHA LONGO MORTATTI e aprovada pela Comissão Julgadora em 22 de agosto de 1997.

Campinas, 22 de agosto de 1997.


Prof. Dr. ROBERTO H. MORETTI
Presidente da Banca

MARIA DA PENHA LONGO MORTATTI †
Farmacêutica-Bioquímica

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Orientador : PROF. DR. ROBERTO HERMÍNIO MORETTI †

CAMPINAS - SP
1997

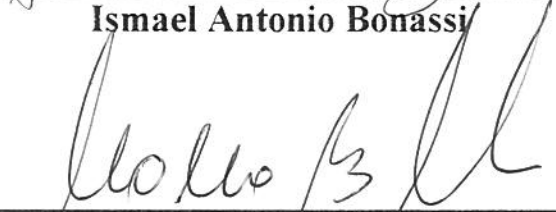
9713615

BANCA EXAMINADORA

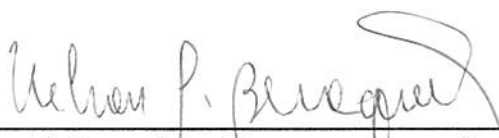

Roberto Hermínio Moretti (orientador)

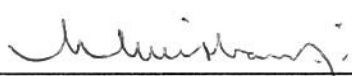
Antonio de Melo Serrano

Ismael Antonio Bonassi


Marco Antonio Zachia Ayub

Roy Edward Bruns


Nelson José Beraquet - suplente


Sebastião Timo Iaria - suplente

Dedico ...

A Deus que mesmo sem ser visível
sempre está a nosso lado,
principalmente nos momentos mais
difíceis.

AGRADECIMENTOS

- À minha família que me incentiva desde o início de minha caminhada.
- Ao Prof.Dr. Roberto Hermínio Moretti que, além de orientador, tem sido amigo e conselheiro nos momentos de maior indecisão.
- À pesquisadora Dilma Scala Gelli, da Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, pelos conhecimentos transmitidos, sugestões apresentadas e pela oportunidade de realizar parte do trabalho experimental naquela seção.
- Aos professores Pedro Ferreira Filho e Francisco Louzada Neto, e ao Luciano Barbosa, pela contribuição no planejamento estatísticos e análises dos resultados.
- Aos professores Marco Antonio Ayub, Ismael A. Bonassi, Roy Edward Bruns e Antonio de Melo Serrano pelas correções e sugestões apresentadas à versão inicial do texto deste trabalho.
- Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, especialmente João Bosco Faria, Ana Lúcia da Silva Corrêa Lemos e Aureluce Demonte, pelas valiosas colaborações, apoio e amizade durante a execução deste trabalho.
- A Adriana e Albertina pelo valioso apoio técnico prestado.
- Ao Sr. Jorge Pasianot, Marivone, Silvia e Sandra da Sadia Concórdia S.A. Indústria e Comércio, Américo Brasiliense.
- A Ana Lúcia, Kátia, Eunice e todos os colaboradores do Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL, Campinas, pelas análises sensoriais.
- A Natalina, Maria Irani, Ângela, Mara, Queila e Ana da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP.
- Ao Renato, Geny e Francisco da Seção de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP.

- Aos professores dos cursos realizados durante o doutorado, que forneceram subsídios teóricos para a estruturação desta tese.
- Ao Toninho, Creusa, Cláudia e todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp.
- A Marlene, Cosme, Susie e Marçal da secretaria do Departamento de Tecnologia de Alimentos - FEA - Unicamp, pelo apoio e amizade.
- Ao Genê, pelo apoio, estímulo e carinho nos momentos difíceis.
- À Maria do Rosário pela revisão do texto
- Ao Marco, Adriane e Paulo pelos serviços de digitação.
- A Myioko, Harumi, Cristiane, Zenaide, Odair, Maria e todo pessoal de apoio da Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo.
- À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, pela concessão da bolsa CAPES/PICD.
- Finalmente, sem que sejam menos importantes, quero deixar aqui a minha gratidão aos que não tiveram os nomes citados, mas sempre me deram sua amizade. Algo que nos engrandece e incentiva...

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1-INTRODUÇÃO.....	1
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1-A microbiota da carne de aves.....	7
2.2-Sanitização da carne de aves.....	16
2.2.1-Emprego de agentes químicos e radiações	16
2.2.2-Emprego de dimetildicarbonato.....	24
2.3-Métodos de avaliação microbiológica de carne de aves.....	35
2.4-Processamento industrial de carne de frango.....	40
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1-Material.....	50
3.1.1-Matéria-prima.....	50
3.1.2-Equipamentos e Vidrarias.....	50
3.1.3-Meios de cultura e reagentes.....	51
3.1.4-Reagentes químicos	52
3.2-Métodos.....	52
3.2.1-Eficiência da solução de dimetildicarbonato utilizada como sanitizante..	52
3.2.2-Eficiência da solução de dimetildicarbonato na inativação de <i>Salmonella enteritidis</i> PT4.....	53
3.2.3-Sanitização de carcaças e partes de frango pelo emprego de dimetildicarbonato.....	54
3.2.3.1-Ensaio I.....	55
3.2.3.2-Ensaio II.....	56
3.2.3.3-Ensaio III.....	57
3.2.3.4-Ensaio IV.....	57
3.2.4-Determinação da vida-de-prateleira de carcaças ou partes de frango,	

submetidas a tratamentos de imersão na solução de dimetildicarbonato.....	58
3.2.4.1-Análise microbiológica.....	58
3.2.5-Otimização de tempo de imersão e concentração de dimetildicarbonato no tratamento de filezinhos de peito de frango.....	59
3.2.5.1-Análise microbiológica.....	63
3.2.5.2-Análise estatística.....	64
3.2.6-Avaliação da ação do dimetildicarbonato em <i>Salmonella enteritidis</i> PT4 inoculada laboratorialmente em filezinho de peito de frango.....	65
3.2.6.1-Contaminação laboratorial de filezinho de peito de frango com <i>Salmonella enteritidis</i> CPHL PT4.....	66
3.2.6.2-Ensaio realizado.....	67
3.2.6.3-Análise microbiológica.....	68
3.2.7-Análise sensorial de peito de frango submetido a tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato.....	69
3.2.7.1-Análise estatística.....	71
3.2.8-Determinações físico-químicas em peito de frango submetido a tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato.....	71
3.2.8.1-Determinação do pH.....	72
3.2.8.2-Determinação da cor pelo Sistema CIE L.*a.*b.*.....	72
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1-Eficiência da solução de dimetildicarbonato utilizada como sanitizante.....	73
4.2-Eficiência da solução de dimetildicarbonato na inativação de <i>Salmonella enteritidis</i> PT4.....	73
4.3-Vida-de-prateleira de carcaças ou partes de frango submetidas a tratamentos de imersão na solução de dimetildicarbonato.....	75
4.3.1-Ensaio I.....	77
4.3.2-Ensaio II.....	79
4.3.3-Ensaio III.....	82
4.3.4-Ensaio IV.....	86

4.4-Otimização de tempo de imersão e concentração de dimetildicarbonato no tratamento de filezinhos de peito de frango.....	90
4.5-Avaliação da ação do dimetildicarbonato em <i>Salmonella enteritidis</i> PT4 inoculada artificialmente em filezinho de peito de frango.....	112
4.6-Avaliação sensorial de peito de frango submetido a tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato.....	117
4.7-Determinações físico-químicas em peito de frango submetido a tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato.....	122
-Avaliação da cor pelo Sistema CIE L.*a.*b.*.....	122
-Avaliação do pH da superfície do músculo	125
-Avaliação do pH da pele.....	126
5-CONCLUSÕES.....	127
6-SUGESTÕES.....	128
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
ANEXOS	

RESUMO

Com vistas ao estudo do efeito do agente sanitizante dimetildicarbonato (DMDC) na redução da flora microbiana da superfície da carne de frango foram realizados, numa primeira fase, 4 experimentos com carcaças ou partes de frangos, submetidos ao tratamento de imersão em solução de DMDC a 17°C, variando-se as concentrações do produto de 2.000 a 25.500 ppm. No primeiro ensaio, carcaças inteiras de frango foram submetidas ao tratamento de imersão em solução contendo 25.500 ppm de DMDC por 10 segundos. No segundo ensaio, peitos de frango com pele e osso foram submetidos ao tratamento em solução de 5.000 ppm de DMDC por 30, 45 e 60 segundos. No terceiro ensaio, peitos de frango com pele e osso foram imersos em solução de 2.000 ppm de DMDC por 15, 30 e 60 segundos e, finalmente, no quarto experimento filezinhos de peito de frango foram tratados por imersão em solução de 2.000 ppm de DMDC por 30 e 60 segundos. Estes ensaios foram realizados visando determinar a relação entre concentração-tempo de exposição ao DMDC e a eficiência antimicrobiana em carne de frango, dados ainda não disponíveis na literatura. Observou-se a eficiência do DMDC na redução da flora de organismos mesófilos na superfície da carne de frango.

Visando a otimização da concentração de DMDC e o tempo de imersão na solução do produto a serem utilizados para aumentar o tempo de vida-de-prateleira de carne de frango refrigerada, elaboramos um experimento delineado estatisticamente pela metodologia de superfície de resposta. Neste estudo, filezinhos de peito de frango foram submetidos ao tratamento de imersão em solução de DMDC com concentração variando de 0 a 6.000ppm e tempos de imersão de 15 a 75 segundos.

O estudo de vida-de-prateleira de filezinhos de peito de frango tratados com DMDC foi realizado por meio de análises sensoriais (odor, cor do músculo e

da gordura e qualidade global) e análises físico-químicas (pH e cor da superfície do músculo pelo sistema CIE L.*a.*b.*).

Os resultados obtidos mostram que o DMDC (4.500 ppm) reduz a contagem de microrganismos deterioradores e patogênicos da ordem de 1 a 2 ciclos logarítmicos, melhorando assim a qualidade microbiológica de filezinho de peito de frango. A eficácia do tratamento com DMDC está relacionada principalmente à concentração do produto utilizada, não apresentando alteração significativa com a variação do tempo de exposição da carne de frango ao produto.

Foi também estudada a eficiência do DMDC na redução de *Salmonella enteritidis* PT4 inoculada artificialmente em filezinhos de peito de frango. Observou-se a eficiência bactericida do tratamento a 4.500ppm de DMDC sobre salmonela nas amostras submetidas ao tratamento de imersão, com agitação do banho.

O tratamento de peito de frango com 4.500ppm de DMDC durante 30 seg. não afeta as qualidades sensoriais como: cor da pele e do músculo, e o odor da carne; também não altera o pH da superfície da carne de frango.

ABSTRACT

In order to study the effect of the dimethyldicarbonate (DMDC) sanitizing agent in reducing the microbial flora on chicken meat surface, initially 4 experiments were made with whole carcasses or chicken pieces, submitted to immersion treatments in DMDC solutions at 17°C, with different product levels (2.000 - 25.500 ppm). In the first experiment, whole chicken carcasses were immersed in 25.500 ppm DMDC solution for 10 seconds. In the second one, chicken breasts with skin and bones, were immersed in 5.000 ppm DMDC solution for 30, 45 and 60 seconds. In the third experiment, chicken breasts with skin and bones were submitted to immersion in 2.000 ppm DMDC solution for 15, 30 and 60 seconds and finally in the fourth experiment, little chicken breast pieces were treated with 2.000 ppm DMDC solutions for 30 and 60 seconds. These experiments were done in order to determine the relation between DMDC concentration and exposure time and antimicrobial efficiency in chickens (data not available in the literature).

The results confirmed the DMDC efficiency in reduction of the microbial flora of the mesophylic bacteria on the chicken meat surface.

To achieve this, statistical response surface methodology was used to optimize the level and exposure time of DMDC for the refrigerated chicken meat. In this experiment little chicken breast pieces were treated with varying concentrations of DMDC solution, 0 to 6.000 ppm, and immersion times of 15 to 75 seconds.

The study of the shelf-life of little chicken breasts pieces, treated by DMDC, was done by sensorial analysis (odour, muscle and fat colours and general quality) and physical chemical determinations (pH and colour of surface muscle by the CIE L.* a.*b.* system).

The results showed that 4.500 ppm of DMDC can reduce the spoilage and pathogenic flora in 1 to 2 log-cycle, improving the microbial quality of the little

chicken breast pieces. The results also pointed out that the DMDC treatment efficiency was mainly related with the concentration showing in significant changes due to exposure time of the chicken meat to the product.

The efficiency of DMDC in reduction of the *Salmonella enteritidis* PT4 artificially inoculated in little chicken breast pieces was tested. Also the positive effect of the DMDC (4.500 ppm) in reducing salmonelae in samples submitted to imersion treatment with shaking, was confirmed.

1. INTRODUÇÃO

O consumo mundial de carnes registrou um expressivo crescimento, de cerca de 16,3%, no período de 1991 a 1996. Cumpre destacar o ocorrido com carne de aves, cujo consumo aumentou 33,18% neste período (SILVA, 1996).

No Brasil a expansão do mercado de carnes foi de 31,6%, sendo que as aves concorreram com um crescimento de 62,2%. No quadro de ofertas de proteínas animais no Brasil, em 1995, a carne de aves e os ovos representaram 43%, contra 38% de carne bovina (SILVA, 1996).

O Brasil é o segundo maior produtor de frangos, com 13% de participação no total produzido mundialmente em 1995, que foi de 33,87 milhões de toneladas. Os Estados Unidos da América ocupam a primeira posição com 35,7% de participação (SILVA, 1996).

Segundo BERAQUET (1992), em substituição ao comércio de frango inteiro, tem-se expandido o comércio do frango refrigerado ou congelado, já recortado em partes e embalados em sacos plásticos, bandejas ou caixas. Há uma tendência natural no aumento da oferta de frango em partes, tanto no mercado interno como para exportação, sendo que em termos percentuais o frango inteiro representa em média 50% da comercialização e as partes, cerca de 45-47%.

De acordo com MULLERAT et alii (1994), a expansão e o contínuo crescimento deste setor dependerão, em larga escala, da capacidade dos produtores em fornecer produtos saudáveis e seguros aos consumidores.

A qualidade da carcaça é mensurável e representa importante fator econômico para os produtores, fornecedores e consumidores. Por isso, para resultados satisfatórios, deve haver uma interação entre todos os setores da

produção de frangos: fábrica de rações, granja de matrizes, central de incubação, produtores, abatedouros e comerciantes (BASSOI, 1994).

A qualidade da carne de aves é considerada ótima imediatamente após o processamento, e a manutenção desta qualidade satisfatória depende do nível microbiano inicial das aves e das medidas para minimizar o crescimento dos microrganismos, que poderão desenvolver-se sob condições errôneas de manuseio (BRYAN & DOYLE, 1995; CUNNINGHAM, 1982). Os principais fatores limitantes da vida-de-prateleira da carne fresca são o crescimento microbiano e as atividades enzimáticas, que influenciam sua aparência e aceitação geral (XAVIER & BERAQUET, 1994).

Entre os microrganismos mais importantes relacionados aos produtos avícolas podemos citar os deterioradores, especialmente *Pseudomonas* spp, bem como os patógenos capazes de causar doenças de origem alimentar (MEAD et alii, 1993; MULLERAT et alii, 1994).

A nível mundial, a freqüência de ocorrência de contaminação por *Salmonella* em produtos avícolas, destinados ao consumo humano, tem provocado não apenas danos à saúde pública, como também repercussões adversas por parte dos meios de comunicação. Isto, por sua vez, tem colocado os produtores avícolas sob grandes pressões econômicas e comerciais (BIO-ADD, 1992).

O controle de microrganismos durante o processamento de aves é essencial para assegurar a qualidade do produto final, tanto em relação à ocorrência de patógenos como deterioradores (MEAD et alii, 1993). As práticas direcionadas à inibição destes microrganismos em produtos avícolas, representam expectativas em relação ao aumento da vida-de-prateleira e aceitabilidade destes produtos pelos consumidores (MULLERAT et alii, 1994).

O aumento do consumo de carne de aves resultou em acréscimo no número de casos de infecções alimentares associadas a estes produtos. Entre as

doenças que podem ser adquiridas pela ingestão de carne de aves insuficientemente cozidas ou recontaminadas ou ainda pelo manuseio da carne crua, estão as salmoneloses e campilobacterioses (BRYAN & DOYLE, 1995). Os riscos de adquirir estas doenças são grandemente influenciados pela presença de patógenos como *Salmonella* e *Campylobacter* spp. nas carcaças de aves e conseqüentemente nos produtos cárneos (DOYLE, 1993; MEAD, 1993; MEAD et alii, 1994).

Estes microrganismos quando presentes na ave viva, contaminam geralmente a superfície de carcaças cruas durante o abate e tendem a disseminar-se na planta nas fases subseqüentes do processamento como escalda, evisceração, resfriamento e corte (BRYAN & DOYLE, 1995; MEAD, 1993; MEAD et alii, 1994; MENDONÇA et alii, 1994). A contaminação cruzada é favorecida pela natureza e rapidez do processamento nos abatedouros modernos (BREWER et alii, 1995; MEAD et alii, 1994).

Os procedimentos de inspeção normalmente utilizados em plantas de processamento incluem medidas preventivas gerais e rigoroso controle da linha de produção, mas não conseguem evitar que estas contaminações ocorram (MENDONÇA et alii, 1994; MOYE & CHAMBERS, 1991). Aves portadoras de salmonelas, por exemplo, nem sempre apresentam lesões específicas, e mesmo que um pequeno número de frangos sejam portadores de reduzido número de *Salmonella* em seu trato intestinal, as carcaças que são livres do organismo podem ser contaminadas em várias etapas do processamento (BAILEY & JAMES, 1986; GIESE, 1991; SHACKELFORD, 1988; TODD, 1980).

Segundo MEAD (1989), as dificuldades em controlar a disseminação de microrganismos durante o processamento de aves incluem: a) a velocidade de produção no abate, que freqüentemente excede 6.000 carcaças/hora em grandes plantas e mantém as aves muito próximas do início ao fim do processo; b) limitações no projeto dos equipamentos, incluindo os empregados na escalda,

depenagem e evisceração, que oferecem pouca ou nenhuma oportunidade de sanitização após a passagem de uma carcaça e a chegada de outra, c) dificuldade de lavagem eficiente da cavidade abdominal depois da evisceração pois as carcaças permanecem inteiras; d) conservação da pele, que tende a reter as bactérias.

Os processos altamente mecanizados desenvolvidos oferecem vantagens em relação à redução de custos e aumento da eficiência, porém os riscos microbiológicos permanecem (BREWER et alii, 1995). Do ponto de vista de saúde pública é importante limitar a proporção de carcaças contaminadas com patógenos e minimizar as contaminações que ocorrem (MEAD, 1993; MEAD et alii, 1993; MEAD et alii, 1994).

As bactérias patogênicas gram-negativas são responsáveis por aproximadamente 69% dos casos de intoxicações alimentares nos Estados Unidos, porém no Brasil, não existem dados disponíveis a esse respeito. Com exceção da listeriose, grande parte das infecções bacterianas podem ser atribuídas à ingestão de células viáveis de patógenos entéricos Gram-negativos (BEAN & GRIFFIN, 1990; MENDONÇA et alii, 1994).

Visando aumentar a segurança dos consumidores em relação à ingestão de produtos de origem animal, constata-se a necessidade do desenvolvimento de processos práticos que possam efetivamente destruir bactérias patogênicas e deterioradoras em instalações de processamento de alimentos.

Estes objetivos não são facilmente aplicáveis e para alcançá-los é necessário um controle higiênico sistemático (JETTON et alii, 1992; MEAD et alii, 1994). Diversas medidas têm sido estudadas visando minimizar a contaminação das carcaças, como o emprego de irradiação e ácidos orgânicos, entre outras técnicas. Outra prática que tem recebido ampla aceitação é o conceito de Análise de Perigos e Pontos de Controle Críticos (APPCC). Este método propõe um meio sistemático de identificar e controlar os perigos microbiológicos associados com o

processamento e manuseio dos alimentos e seu uso tem sido proposto para o processamento de aves e seus produtos (MEAD, 1989; MEAD, 1993; MEAD et alii, 1993; SIMONSEN et alii, 1987; TOMPKIN, 1990).

Por outro lado, existe grande interesse econômico no desenvolvimento de técnicas que aumentem a vida útil da carne de aves, devido, principalmente, à necessidade de distribuição a lugares distantes para suprimento do mercado interno, bem como exportações (XAVIER & BERAQUET, 1994).

As indústrias de abate de aves percorreram um longo caminho em espaço de tempo muito curto, investindo em produção e processamento, mas muitas pesquisas têm que ser realizadas no sentido de melhorar ou manter a qualidade final das carcaças, por tempo mais prolongado que os atuais 7-8 dias.

O objetivo deste estudo foi verificar a viabilidade do agente sanitizante dimetildicarbonato (DMDC) na redução da flora microbiana de carcaças ou partes de frango.

O DMDC é um agente antimicrobiano, empregado nos Estados Unidos e Europa, para a esterilização de vinhos. O produto hidroliza-se rapidamente após a aplicação, produzindo metanol e dióxido de carbono, sem deixar resíduos tóxicos. É eficiente na inativação de diversos gêneros de bactérias, bolores e leveduras.

Visando a otimização da concentração de DMDC e tempo de imersão na solução do produto em função da vida-de-prateleira de carne de frango refrigerada, foi utilizada a metodologia estatística denominada Superfície de resposta. Para este ensaio, as partes de frango foram imersas em soluções com concentrações de DMDC variando de 0 a 6.000 ppm e tempos de imersão de 15 a 75 segundos.

O estudo da vida-de-prateleira foi realizado por meio de análises microbiológicas (contagem total de bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias

facultativas), análises sensoriais (odor, cor do músculo e da gordura e qualidade global) e físico-químicas (pH e cor da superfície do músculo e da pele, pelo sistema CIE L*.a*.b*.).

Procurou-se também avaliar a eficiência do DMDC na redução de *Salmonella enteritidis* PT4 em filezinho de peito de frango, com contaminações realizadas a nível laboratorial com número de células próximos ao normalmente encontrados em tanques de resfriamento de frangos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A microbiota da carne de aves

A flora microbiana das carcaças de aves, imediatamente após o abate, reflete a população de bactérias mesófilas nas aves antes do abate (RUSSELL et alii, 1994), portanto é extremamente influenciada pelas condições microbiológicas da ave viva (MULDER & BOLDER, 1984).

A flora microbiana inicial das carcaças de aves imediatamente após o processamento consiste de aproximadamente: 35% *Micrococcus*, 24% *Coryneforms*, 16% *Lactobacillus*, 16% *Enterobacteriaceae*, 3% *Aeromonas* e *Vibrio*, 2% *Pseudomonas* (RUSSELL et alii, 1994; RUSSELL et alii, 1996).

RUSSELL et alii (1994; 1996) consideram que os microrganismos encontrados inicialmente nas carcaças em níveis elevados são considerados mesófilos. Entretanto, após o armazenamento das carcaças a 4°C, os organismos mesófilos não podem competir com o rápido crescimento dos psicrotróficos, como *Pseudomonas*, que, em temperaturas baixas, multiplicam-se com maior rapidez.

A vida de prateleira de aves frescas varia em função da flora contaminante inicial e da temperatura de armazenamento. Após o processamento e durante as fases de distribuição e venda, as carcaças podem ser expostas a temperaturas inadequadas de refrigeração. Condições de abuso de temperatura favorecem a multiplicação de bactérias mesófilas na carne de aves (RUSSELL et alii, 1992).

A população bacteriana, na superfície das carcaças de aves cruas, no final do processamento varia, mas geralmente encontra-se na faixa de 10^3 a 10^5 organismos aeróbicos mesófilos / cm^2 (BRYAN & DOYLE, 1995).

Durante o processamento de aves, a contaminação microbiana é indesejável, porém inevitável e ocorre como consequência das etapas do processo (CONNER & BILGILI, 1994; MEAD, 1993; MEAD et alii, 1994; THOMAS & McMEEKIN, 1980). A cada estágio, existem inúmeras oportunidades para contaminação das carcaças por microrganismos, podendo ocorrer através daqueles presentes na planta de processamento ou por contaminação cruzada entre as aves (KAMPELMACHER, 1987; THOMAS & McMEEKIN, 1980). Assim, o número de bactérias na superfície das carcaças pode variar consideravelmente nos diferentes estágios do processamento (THOMAS & McMEEKIN, 1980).

As aves carregam naturalmente grande variedade de bactérias para a planta de processamento. Esta microflora pode ser transferida para a superfície das carcaças durante o abate. A maioria destas bactérias não são patogênicas mas constituem o principal fator que afeta a vida-de-prateleira de aves (CONNER & BILGILI, 1994).

Bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* 0157:H7 são freqüentemente encontradas em carne de aves (BRYAN & DOYLE, 1995; CONNER & BILGILI, 1994; JETTON et alii, 1992; KAMPELMACHER, 1987; MEAD, 1993; MORRISON & FLEET, 1985).

Dados sobre a incidência de infecções alimentares nos EUA, mostraram que produtos avícolas foram responsáveis por 54% dos surtos ocorridos entre 1968 - 77. Uma avaliação no período de 1977 - 1984, mostrou que esses alimentos foram identificados como veículos em 33% dos surtos (BRYAN & DOYLE, 1995; TOMPKIN, 1990).

De acordo com BRYAN & DOYLE (1995), a frequência de contaminação por *Campylobacter jejuni* em produtos avícolas varia de 0 a 100%, com uma média de 62% de positividade. Em carcaças logo após a evisceração foi encontrada uma população de 10^6 células por carcaça. Estudos realizados por WALDROUP (1993) e WALDROUP et alii (1992) em cinco diferentes plantas mostraram que a população de *C. jejuni* variou de 10^2 a 10^4 UFC / carcaça.

Levantamentos realizados em diferentes países revelam que de 30 a 50% das carcaças de frangos comercializadas refrigeradas ou congeladas são contaminadas com *Salmonella* (CUNNINGHAM, 1982; DUBBERT, 1988; KAMPELMACHER, 1987; LI et alii, 1994; MORRISON & FLEET, 1985; ROBERTS, 1991; SHACKELFORD, 1988; SILLIKER, 1982; TODD, 1980).

A população de salmonelas é baixa e geralmente encontra-se ao redor de 1 a 30 células, sendo ocasionalmente encontrada ao nível de 10^4 UFC / 100 g de pele (BRYAN & DOYLE, 1995). Outras investigações observaram níveis de 5 a 100 células de *Salmonella* por carcaça (MULDER & BOLDER, 1984).

CONNER & BILGILI (1994) descreveram que 47 a 80% de aves coletadas em pontos de venda no varejo apresentavam-se contaminadas com *Campylobacter jejuni*, enquanto 17 a 77% de aves frescas apresentavam-se contaminadas com *Salmonella*.

No Brasil, estudos referentes à pesquisa de aves portadoras de salmonelas de materiais colhidos em abatedouros e em produtos de origem animal, ainda são em pequeno número e sem continuidade (GIORGI, 1982).

Os principais sorotipos de *Salmonella* freqüentemente descritos em carne de aves são: *Salmonella heidelberg*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* (ALTEKRUSE et alii, 1993; HINTON, 1992). A frequência de *S. enteritidis* fagotipo 4 (PT4) aumentou consideravelmente de 0% no período de

1979-80 para 16% em 1987 e 21% em 1990 (ROBERTS, 1991; HARGIS et alii, 1995).

O controle de *S. enteritidis* tem se revelado como um problema complexo, exigindo ação integrada em múltiplos pontos na produção de aves. Enquanto muitos patógenos causam doenças no plantel, os sinais de infecção por *S. enteritidis* são pouco perceptíveis (ALTEKRUSE et alii, 1993; HINTON, 1992).

A disseminação de patógenos na linha de produção de aves é grandemente influenciada pela natureza do sistema de criação, crescimento e processamento das aves, ou seja, pelas práticas de produção; desta forma as salmonelas podem ser introduzidas no ciclo de produção das aves, desde a incubadora (ALTEKRUSE et alii, 1993; MEAD, 1993).

Em função da pressão de mercados competitivos, a tendência da indústria de ovos é direcionar sua produção em larga escala. De 10.000 a 100.000 aves podem permanecer no mesmo galpão, participando do mesmo suprimento de ração, água e do sistema de coleta de ovos. Estas condições predispõem à disseminação de salmonelas a partir de fontes ambientais, além do solo, sujeira, fezes, insetos, ração e o homem (ALTEKRUSE et alii, 1993; KAMPELMACHER, 1987), como pode ser ilustrado no ciclo de infecção abaixo.

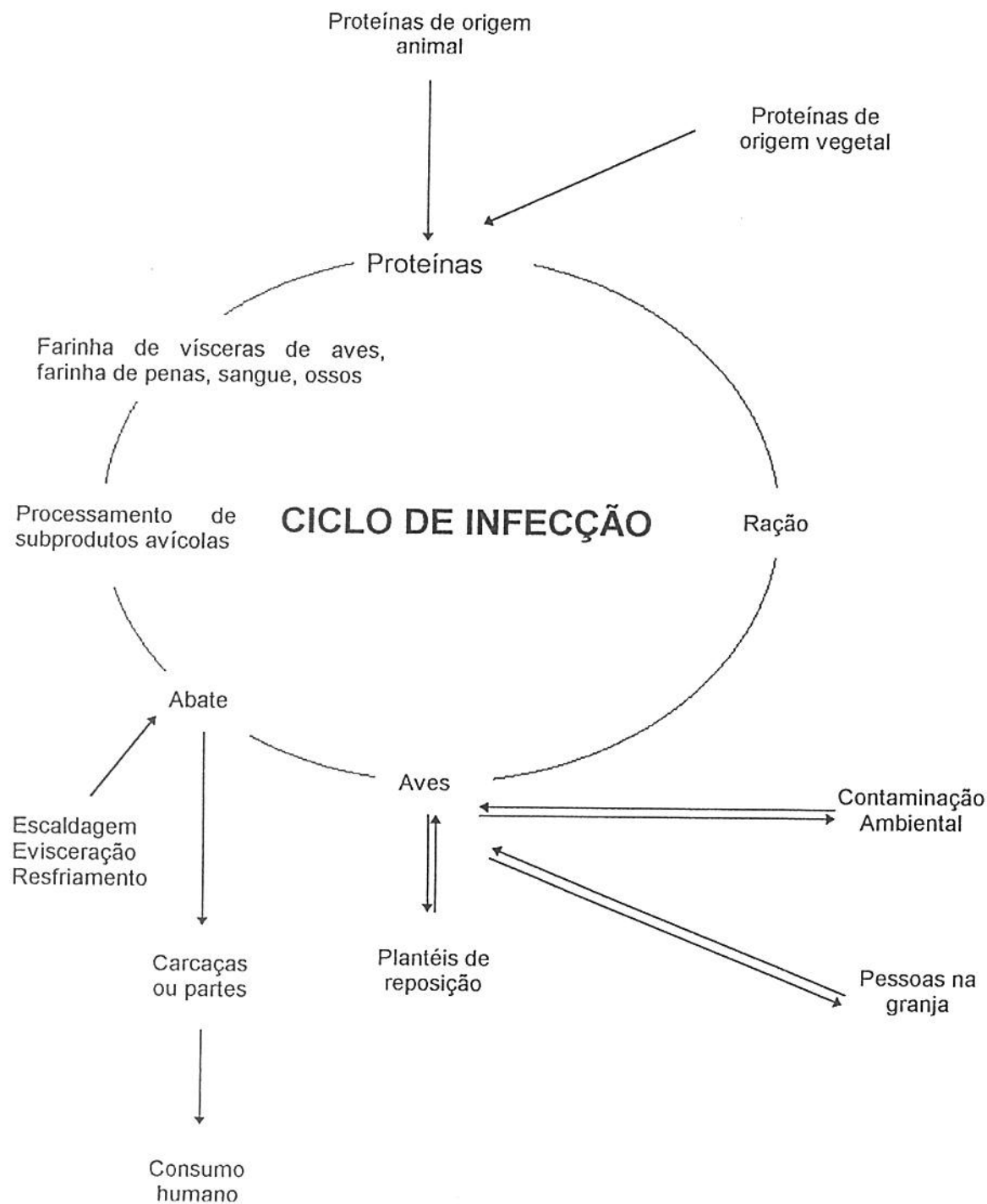


FIGURA 1. Ciclo de infecção por *Salmonella* durante as etapas de produção de frangos.

Fonte: BIO-ADD O aditivo essencial para controle de *Salmonella*.
 In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, APINCO, 1992. (Diagrama modificado pelo autor).

As rações ou farinhas de origem animal contaminadas que são preparadas com subprodutos de origem animal como carne, ossos, vísceras, penas e sangue são considerados como principais veículos de contaminação de aves, fazendo com que as mesmas transformem-se em portadoras (BIO-ADD, 1992; SHACKELFORD, 1988). Salmonelas presentes nas fezes também são transferidas para penas e pele das aves durante o transporte até o abatedouro (BRYAN & DOYLE, 1995).

O processamento tende a favorecer a disseminação da contaminação microbiana. Um dos problemas mais difíceis de controlar é a contaminação cruzada, que resulta de aerossóis, água do processo e contato entre carcaças e equipamentos ou mãos dos operadores (BRYAN & DOYLE, 1995; MEAD, 1993; SHACKELFORD, 1988). Também, a velocidade das linhas é tal que fica difícil a sanitização de equipamentos e utensílios (MEAD, 1993).

Os estágios do processamento freqüentemente implicados como sítios de contaminação cruzada de patógenos são: escalda, depenagem e evisceração (HUMPHREY et alii, 1981; KAMPELMACHER, 1987; MEAD, 1993; NOTERMANS et alii, 1975; SHACKELFORD, 1988; TODD, 1980).

Durante a escalda, patógenos presentes nas penas, pés e pele são lavados. Neste tanque existe ampla oportunidade de contaminação cruzada especialmente quando a água é mantida a 50 - 58 °C. Sob estas condições, é mínima a destruição de patógenos presentes. Apesar da reposição contínua da água, os contaminantes acumulam-se em números elevados no tanque (BRYAN & DOYLE, 1995; HUMPHREY et alii, 1981; MEAD, 1993; OKREND et alii, 1986).

Durante o próximo estágio, a depenagem, ocorre considerável contaminação da pele das aves com *Salmonella* e *Campylobacter*. Nesta etapa, os microrganismos são disseminados através da contaminação dos dedos de borracha que esfregam a superfície de cada carcaça. Além disso, aerossóis gerados durante a

operação, disseminam microrganismos para carcaças, equipamentos, operadores e outras superfícies no ambiente (BRYAN & DOYLE, 1995; HUMPHREY et alii, 1981; MEAD, 1993; CLOUSER et alii, 1995; COX, 1988).

Na etapa de evisceração, a transferência de microrganismos continua ocorrendo. A retirada do trato intestinal, quer por operação manual ou por equipamento mecânico, freqüentemente é responsável por contaminação fecal, devido a cortes e microfuros no intestino. A disseminação de material fecal poderá transmitir qualquer patógeno entérico como *Salmonella* e *Campylobacter* (BRYAN & DOYLE, 1995; MEAD, 1993).

Durante a etapa de inspeção, aves não saudáveis, podem ser detectadas e removidas do processamento. Entretanto, aquelas contaminadas por microrganismos patogênicos, presentes na pele e superfície dos músculos, não podem ser detectadas por inspeção visual (BRYAN & DOYLE, 1995; KAMPELMACHER, 1987).

Na etapa seguinte, ocorre a lavagem da cavidade abdominal, que é uma região geralmente de difícil limpeza. Mesmo com lavagens dentro e fora, muitos contaminantes permanecem nas superfícies interna e externa das aves (BRYAN & DOYLE, 1995; MEAD, 1993).

No processamento industrial, a imersão das carcaças em um banho de resfriamento é utilizada para remover o calor residual e resfriar rapidamente as mesmas, com o objetivo de inibir o desenvolvimento microbiano e outros processos responsáveis pela deterioração do produto. As carcaças são transportadas de uma extremidade a outra do "chiller" e neste processo, sangue, gorduras e outras partículas são retiradas e ficam em suspensão na água (CHANG et alii, 1989; MEAD, 1993; MEAD et alii, 1994).

Ocorre uma lavagem geral das carcaças durante sua passagem pelo "chiller", o que resulta em uma redução da carga microbiana, mas existem evidências de que ocorre contaminação cruzada entre as carcaças (BAILEY &

JAMES, 1986; BRYAN & DOYLE, 1995; KAMPELMACHER, 1987; LILLARD, 1994; LILLARD, 1982).

O fato das bactérias serem "lavadas" das carcaças, resulta em contaminação bacteriana da água do chiller. Por esta razão muitas plantas de processamento decidiram clorar a água do chiller e LILLARD (1982), sugeriu o emprego de 20 ppm de cloro, quantidade esta permitida em vários países.

A contaminação cruzada durante o processamento pode levar a um aumento na incidência de carcaças contaminadas. Alguns estudos demonstraram que o número de carcaças salmonela - positivas aumentou de 3 a 5% antes do processamento para 36% de positividade após o mesmo (CONNER & BILGILI, 1994; LI et alii, 1994).

As práticas de processamento não resultam em carcaças livres de *Salmonella* ou *Campylobacter* e muitas bactérias aderem-se firmemente as mesmas (BRYAN & DOYLE, 1995; LILLARD, 1994; LILLARD, 1989).

Segundo BENEDICT et alii (1991), as salmonelas são difíceis de serem removidas das penas, tecidos musculares ou superfícies de equipamentos após o abate. Mesmo com o emprego de detergentes, sprays sob alta pressão com ou sem germicidas clorados, ou por alteração de pH em águas ou soluções de lavagem, muitos organismos viáveis permanecem nas superfícies das carcaças (OKREND et alii, 1986; SHACKELFORD, 1988).

De acordo com THOMAS & McMEEKIN (1980), o mecanismo de contaminação inicial envolve a retenção das bactérias em um filme líquido sobre o pele, de onde os microrganismos migram e ficam retidos nas saliências da pele. As bactérias já estão firmemente ligadas à pele das aves quando estas chegam à planta de processamento e um incremento deste processo ocorre durante a escalda (LILLARD, 1989; LILLARD, 1986). Nesta etapa os poros abrem-se para facilitar a remoção das penas, permanecendo abertos até as carcaças atingirem o tanque de

resfriamento, quando os poros fecham-se retendo os microrganismos (BRYAN & DOYLE, 1995).

Em função da água adsorvida durante a imersão, certos organismos como *Salmonella* aderem-se no material ao redor das fibras de colágeno e no material polissacarídico. Isto faz com que os patógenos firmemente ligados à pele sejam inacessíveis aos bactericidas que possam ser aplicados e assim podem contaminar todo o processamento (BENEDICT et alii, 1991; BRYAN & DOYLE, 1995; CONNER & BILGILI, 1994; LILLARD, 1994; LILLARD, 1989; LILLARD, 1986; THOMSON et alii, 1979).

JAMES et alii (1992), confirmando esta observação, mostraram que a cloração da água de resfriamento de frangos, não diminui o número de carcaças *Salmonella*-positivas após a saída das mesmas do “chiller”. Concluíram que o cloro não ataca as células do microrganismo ligadas à pele, porém reduz efetivamente o número de salmonelas presentes na água, prevenindo assim um aumento do número de carcaças *Salmonella* - positivas.

Do exposto observa-se que a contaminação das carcaças pode ocorrer em qualquer etapa ao longo do processamento. A intensidade de contaminação irá depender da carga microbiana dos animais vivos, bem como dos processos de sanitização utilizados.

2.2. Sanitização da carne de aves

2.2.1. Emprego de agentes químicos e radiações

Uma série de tratamentos químicos e físicos para sanitização de carne de aves tem sido propostos para utilização em plantas de processamento, visando reduzir a carga microbiana tanto de organismos patogênicos como deterioradores naturalmente presentes nas aves.

Os compostos de cloro (hipoclorito, ácido hipocloroso e cloro) tem sido considerados como bactericidas de escolha e são usados para controlar o crescimento de bactérias em várias indústrias de alimentos (FOEGEDING et alii, 1986; LILLARD & THOMSON, 1983; THOMSON et alii, 1979; PARK et alii, 1991; UNITED STATES OF AMERICA, 1994).

Contudo, o emprego de cloro em águas que contém matéria orgânica pode resultar na formação de compostos orgânicos halogenados, tais como trihalometanos que parecem ter efeito carcinogênico. Também a reação do cloro com compostos orgânicos reduz ou mesmo anula seu efeito bactericida (BRYAN & DOYLE, 1995; FOEGEDING et alii, 1986; HARAKEH et alii, 1988; LILLARD & THOMSON, 1983; LILLARD, 1980b; HATHCOX et alii, 1995; PARK et alii, 1991). Portanto as pesquisas foram encaminhadas à procura de desinfetantes alternativos.

Segundo BANWART (1979), o tratamento das carcaças com água clorada além de limitar o crescimento dos microrganismos deteriorantes, minimiza o número de bactérias potencialmente patogênicas como salmonelas, que podem estar

presentes. A eficiência bactericida dos sanitizantes a base de cloro é dependente do tipo e concentração do composto de cloro empregado, pH, temperatura, período de contato, tipo de microrganismo e presença de material orgânico. Variações em um ou mais dos fatores acima podem levar a resultados errôneos em condições comerciais.

Diversas tecnologias tais como irradiação, emprego de dióxido de cloro, ácidos orgânicos, fosfato trisódico e ozona, têm sido testadas visando reduzir a incidência de bactérias patogênicas em produtos crus de origem animal, como carnes bovinas e de aves.

Segundo MAREL et alii (1988), os agentes descontaminantes devem apresentar algumas propriedades importantes, tais como: exercerem atividade antimicrobiana rápida contra ampla faixa de microrganismos; não deixarem resíduos que possam ser prejudiciais à saúde do consumidor; serem baratos, fáceis de usar e prontamente disponíveis; serem estáveis e resistentes à presença de matéria orgânica; exercerem sua ação em ampla faixa de pH, dureza de água e temperatura; não serem corrosivos e serem solúveis em água (GUTHRIE, 1988).

A irradiação tem sido usada para eliminar bactérias patogênicas em carnes vermelhas e de aves. Diversas pesquisas demonstraram que doses de irradiação de 2 a 9 kGy foram eficientes na eliminação de patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Campylobacter jejuni*. Porém, seu uso comercial tem sido restrito, devido aos altos custos de instalação bem como a restrição normalmente observada por parte dos consumidores em relação à produtos irradiados (FU et alii, 1995; KAMAT et alii, 1991; KAMAT & NAIR, 1995; KAMPELMACHER, 1987; LAMUKA et alii, 1992; LEWIS & CORRY, 1991; MULDER, 1984; THAYER & BOYD, 1993; THAYER et alii, 1992).

XAVIER & BERAQUET (1994), em uma revisão sobre o emprego de irradiação em carne de aves, descreveram as doses recomendadas e seus efeitos na qualidade geral da carne.

Numerosos estudos realizados descrevem o efeito inibitório do abaixamento do pH e de diferentes concentrações de ácidos orgânicos como láctico, acético e cítrico, oferecendo possibilidades de reduzir a contaminação por *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 na superfície de produtos cárneos crus (DICKSON, 1991; MAREL et alii, 1988; MAREL et alii, 1989; MULDER et alii, 1987; OKREND et alii, 1986; SILVA, 1996; SMULDERS et alii, 1986; ZEITOUN & DEBEVERE, 1991). Dentre eles, o ácido láctico tem sido descrito como um agente descontaminante promissor (SMULDERS et alii, 1986).

A atividade antimicrobiana exercida pelos ácidos orgânicos depende de fatores como: redução do pH do meio, minimização da dissociação do ácido e maximização da toxicidade da molécula do ácido. Os ácidos fracos tendem a ser mais eficientes que os ácidos fortes pois acidificam o interior da célula, acumulando-se no citoplasma. Um pH abaixo de 5,5 é necessário para reduzir o crescimento microbiano. O efeito antimicrobiano varia com o ácido usado e com a espécie microbiana (XAVIER & BERAQUET, 1994).

SMULDERS et alii (1986) realizaram uma extensa revisão sobre a aplicação de ácido láctico para descontaminação de carnes e concluíram que a eficiência do tratamento depende de fatores como a quantidade e natureza da contaminação inicial, além da concentração e temperatura em que o mesmo é empregado. Desta forma, com contaminações iniciais muito altas, a concentração de ácido láctico deve ser elevada para o mesmo efeito letal; quando a contaminação inicial é baixa observa-se que o efeito letal, embora significativo, não excede a 2 ou 3 ciclos logarítmicos. Em relação à concentração, verifica-se que o efeito exercido

pelo ácido é comprovadamente maior quando este é usado em concentrações mais elevadas, sendo o limite aquele em que começam a ocorrer mudanças nas propriedades sensoriais do produto. A eficiência antimicrobiana do ácido láctico é notadamente maior a 35°C do que a temperatura de refrigeração.

MAREL et alii (1988; 1989) estudaram o efeito do tratamento de descontaminação de carcaças por tratamento de imersão em ácido láctico a 1 e 2% (v/v) em pH 2,0. Observaram que as carcaças tratadas com 1% de ácido láctico apresentaram reduções bacterianas da ordem de 1 ciclo logarítmico. Porém, o emprego de concentrações mais elevadas ou tratamentos subsequentes com este ácido não demonstraram reduções mais significativas na contaminação de carcaças de aves.

A aplicação do ácido láctico pode ser feita por aspersão ou imersão em solução. No segundo caso deve-se controlar a concentração adequada da solução durante o processo, uma vez que o mesmo pode ligar-se a proteínas e peptídeos, perdendo assim seu efeito, devido à diminuição da concentração (XAVIER & BERAQUET, 1994).

OKREND et alii (1986) estudaram o efeito do ácido acético em soluções de 1, 0,2 , 0,1 e 0,028% na destruição de *Salmonella newport*, *S. typhimurium* e *Campylobacter jejuni*, aplicado à temperatura de 52°C, na água de escaldagem de aves. Verificaram que as soluções de concentrações superiores a 0,1% reduziram drasticamente os três tipos de bactérias. Como a escaldagem é a primeira etapa no processo de abate de aves, a diminuição de patógenos nesta fase pode reduzir a disseminação nas etapas seguintes.

DRESSEL & LEISTNER (citado por XAVIER & BERAQUET, 1994) avaliaram o efeito de uma solução contendo ácido acético (2%), ácido láctico (1%), ácido cítrico (0,25%) e ácido ascórbico (1%) na descontaminação de carcaças de frango e observaram uma redução de 10 vezes nas contagens das amostras. A vida

de prateleira das amostras tratadas foi aproximadamente o dobro das não tratadas, mas as primeiras apresentaram ligeiro odor ácido e palidez.

RISTIC & OSTHOLD (1984) verificaram que os efeitos de vários ácidos (acético, láctico, cítrico e ascórbico) a 1 ou 2 % , aplicados durante 5 segundos ou 1 minuto, foram semelhantes ao do sorbato de potássio a 20%, aplicado durante 10 segundos, na descontaminação de carcaças de frango.

MORRISON & FLEET (1985) avaliaram diferentes tratamentos de descontaminação de carcaças de frango: solução aquosa de cloro a 50 ppm a 18°C e a 60°C; solução aquosa de cloro a 200 ppm a 18°C e a 60°C; solução aquosa de cloro a 500 ppm a 18°C; solução de cloreto de sódio 5% a 18°C; solução de cloreto de sódio 5% a 60°C; solução de ácido láctico 0,25% a 18°C; solução de sorbato de potássio 2,5% a 18°C e a 60°C; solução de fosfato 3% a 18°C e 60°C. Concluíram que tratamentos de imersão em soluções de 200 ppm de cloro ou 2,5% de sorbato de potássio foram mais eficientes.

HWANG et alii (1995) avaliaram o efeito do tratamento de imersão da pele de carcaças de frango, contaminadas com diversos microrganismos patogênicos, em solução contendo 0,5% de ácido láctico e 0,05% e benzoato de sódio. Observaram reduções na população de *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* e *Staphylococcus aureus*; o tratamento não afetou a qualidade sensorial das carcaças.

ZEITOUN & DEBEVERE (1991) estudaram o efeito do tratamento por aspersão com solução de ácido láctico/lactato de sódio tamponado a pH 3,0 em concentrações de 2%, 5% e 10% p/v, combinado com empacotamento sob atmosfera modificada (MAP- 90% CO₂ e 10% O₂,) sobre uma cepa de *L. monocytogenes* inoculada artificialmente em partes de frango. Observaram reduções significativas no número de células inoculadas e na contagem de bactérias psicotróficas, o que resultou em aumentos de 2 a 11 dias na vida de prateleira das

partes de frango. A eficiência da mistura tamponada ácido láctico/lactato de sódio (pH 3,0) aumentou com maiores concentrações de ácido láctico no sistema tamponado. Os melhores resultados foram obtidos com o emprego da solução tamponada de ácido láctico 10% /lactato de sódio (pH 3,0), combinado com MAP, sendo observado um efeito sinérgico dos dois tipos de tratamento.

MULDER et alli (1987) estudaram o efeito de diferentes concentrações de ácido láctico e peróxido de hidrogênio como agentes descontaminantes de carcaça de frango visando a destruição de *Salmonella typhimurium*. Concluíram que o tratamento com ácido láctico a 1% e peróxido de hidrogênio 0,5%, após um período de contato de 10 minutos, reduziram em 4 ciclos logarítmicos a contagem do microrganismo tanto em culturas puras, quanto em carcaças inoculadas artificialmente.

LILLARD & THOMSON (1983) testaram o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como um agente bactericida adicionado à água de resfriamento de aves. Verificaram que de 6.600 ppm a 12.000 ppm de H_2O_2 reduziu a contagem total de organismos aeróbios na água em 95-99%, e a adição de 5.300 a 12.000 ppm de H_2O_2 reduziu a contagem de *E. coli* na água em 97-99,9%. Observaram, porém, alterações na aparência e textura da pele das carcaças, que é indesejável na comercialização das mesmas, mas poderia ser aplicado em carcaças que serão desossadas.

Várias pesquisas demonstraram o composto dióxido de cloro como um desinfetante de eficiência maior ou igual do que o cloro, e seu uso não resulta na formação de compostos orgânicos halogenados como ocorre com o cloro. Além disso, o dióxido de cloro pode proporcionar ação bactericida equivalente à do cloro, mesmo empregado em níveis mais baixos (COSTILOW et alii, 1984; EMSWILLER-ROSE & KOTULA, 1984; FOEGEDING et alii, 1986; HARAKEH et alii, 1988; LILLARD, 1980a; LILLARD, 1980b; LILLARD, 1979).

LILLARD (1979), avaliou o efeito bactericida na água do “chiller”, de níveis equivalentes de cloro e dióxido de cloro. O dióxido de cloro foi gerado pela reação entre uma solução de cloreto de sódio e cloro em um sistema apropriado. Concluiu que, quando introduzidos na água do chiller, em separado, no início do processamento, 20 ppm de cloro e 3 ppm de dióxido de cloro foram igualmente efetivos. Quando introduzidos após o início da entrada das carcaças, 5 ppm de dióxido de cloro e 34 ppm de cloro foram igualmente bactericidas. O emprego de 1/7 de dióxido de cloro a menos que cloro pode ser menos corrosivo para o equipamento.

COSTILLOW et alii (1984) também estudaram o efeito bactericida do dióxido de cloro e concluíram que ele foi 10 vezes mais eficiente do que o cloro ou soluções acidificadas de dióxido de cloro estabilizado.

HARAKEK et alii (1988) estudaram a eficiência bactericida de uma solução aquosa estabilizada de dióxido de cloro, empregando bactérias de interesse à saúde pública como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*. Concluíram que o desinfetante Purogene foi eficaz contra todos os microrganismos testados.

EMSWILLER-ROSE & KOTULA (1984) avaliaram a eficiência bactericida de hipoclorito de cálcio e dióxido de cloro, em concentrações variadas, sobre 18 culturas puras e 2 culturas mistas de bactérias deterioradoras e patogênicas normalmente associadas com carne de aves. Concluíram que o dióxido de cloro foi mais eficiente contra bactérias Gram positivas do que contra as Gram negativas.

O uso de ultrassom também tem sido proposto para reduzir a contaminação bacteriana em carcaças de frango. LILLARD (1993; 1994) avaliou o efeito da aplicação de ultrassom juntamente com cloro sobre uma cepa de *Salmonella* artificialmente inoculada em pele de frango. Observou reduções de 2,5 a 4,0 ciclos logarítmicos nas contagens de *Salmonella*.

Diversos estudos também mostraram que a vida de prateleira de carne de frango fresca pode ser significativamente aumentada, utilizando-se o empacotamento sob atmosfera modificada de CO₂ (SARANTOPOULOS et alii, 1995; SAWAYA et alii, 1993; GILL et alii, 1990).

A atividade antimicrobiana de fostato trisódico também tem sido avaliada. O produto mostrou-se eficiente na redução de microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Campylobacter* sp em carcaças de frango (GIESE, 1993; HWANG & BEUCHAT, 1995; UNITED STATES OF AMERICA, 1994).

RATHGEBER & WALDROUP (1995) avaliaram o efeito do tratamento de imersão de carcaças de frango em solução contendo mistura de fosfatos (Brifisol ®) e observaram reduções significativas nas contagens de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* com a aplicação do produto. Verificaram que o tratamento aumentou em 1 a 2 dias a vida de prateleira de carcaças armazenadas a 4,4°C.

Recentemente, um novo sanitizante, Salmide® (etilenodiaminotetracetato de sódio) tem sido estudado e mostrou-se eficaz na redução de patógenos como *Salmonella enteritidis*, *S. heidelberg*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (MULLERAT et alii, 1994; MULLERAT et alii, 1995).

O efeito de ozona na água de resfriamento de frangos também tem sido avaliado (UNITED STATES OF AMERICA, 1994). SHELDON & BROWN (1986) observaram que carcaças tratadas com ozona e armazenadas a 4,4°C apresentaram reduções significativas na contagem microbiana e não foram observadas quaisquer alterações sensoriais nas carcaças após o tratamento.

2.2.2. Emprego de dimetildicarbonato (DMDC)

BAYER (citado por OUGH, 1983), em 1959, foi o primeiro a introduzir o dietildicarbonato (DEDC), também conhecido como dietilpirocarbonato (DEPC) para testes antimicrobianos. Outro agente testado, e que mostrou-se igualmente eficaz, foi o dimetildicarbonato (DMDC).

O dietildicarbonato (DEDC), conhecido comercialmente como Baycovin, foi amplamente utilizado nos Estados Unidos e Europa para a preservação de bebidas carbonatadas, sucos de frutas, vinho e cerveja, sendo o processo denominado de esterilização a frio (ROSE, 1983; JAY, 1978; DAVIS, 1972; GENTH, 1971). O DEDC é eficiente na inativação de leveduras e bolores como *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* e *Byssoschlamys fulva*, além de bactérias não esporuladas (SPLITTSTOESSER & WILKISON, 1973; GENTH, 1971). Foi largamente estudado como aditivo antimicrobiano em produtos alimentícios tais como embutidos (SHIBASAKI, 1969), vinagre (YANAGIDA & SUMINOE, 1972) e outras bebidas alcoólicas (OKAFOR, 1975).

O DEDC hidroliza-se quando em contato com água e GENTH (1971), propôs que o primeiro passo da reação é a formação de etilcarbamato que decompõe-se rapidamente a etanol e dióxido de carbono. A hidrólise e outras reações completam-se em menos de 24h., sendo que na faixa de pH de 3,0 e 4,0 foi demonstrado que o DEDC reage com amônia formando uretano (etilcarbamato) (OUGH, 1983; SIMAL GANDARA, 1989).

LÖFROTH & GEJVALL (1971) relataram que grandes quantidades de etilcarbamato e uretano foram detectados em bebidas tratadas com DEDC. O uretano é considerado um potente carcinógeno.

Em função deste estudo, o “Food and Drug Administration” (F.D.A.) revogou, em 1972, o uso de dietildicarbonato para preservação de bebidas (FINE, 1972).

Estudos subseqüentes (OUGH, 1983; 1976b) relataram que, sob condições industriais de tratamento de vinho com DEDC, as quantidades de uretano formadas foram muito pequenas, sendo detectados níveis de 100 a 200 vezes menores do que os descritos por LÖFROTH & GEJVALL (1971). Além disso, a concentração de uretano formado varia em função do pH e da presença de substâncias reativas como amônia (OUGH, 1976b).

OUGH (1976a) também demonstrou que o etilcarbamato é um componente naturalmente presente em vinhos, bebidas e alimentos fermentados, não tendo sido detectado em produtos não fermentados.

SHARRATT et alii (1972) avaliaram o efeito da ingestão de elevadas concentrações de vinhos e suco de laranja tratados com DEDC em cobaias e não detectaram quaisquer efeitos adversos nestes animais.

Apesar de todos estudos subseqüentes sobre o dietildicarbonato (DEDC), o F.D.A. decidiu manter a proibição do uso do produto.

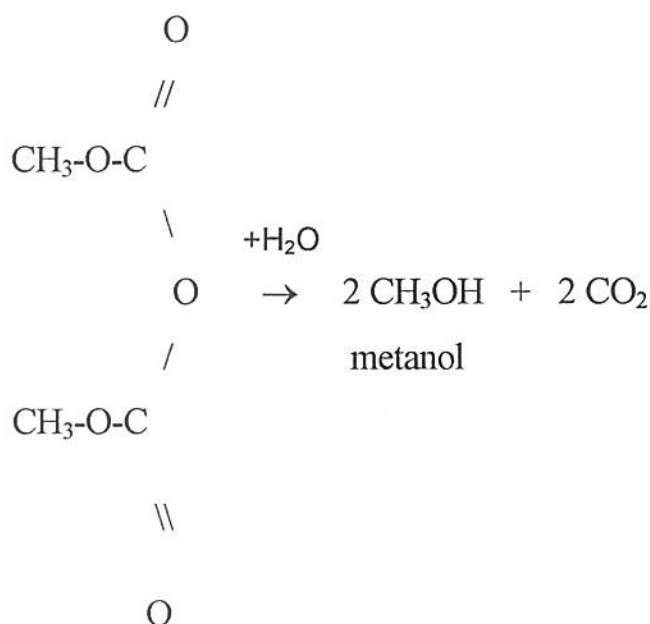
Um aditivo proposto para substituir o DEDC e que apresenta propriedades antimicrobianas similares foi o dimetildicarbonato (DMDC) (OUGH, 1975; GENTH, 1979).

Numerosos estudos avaliaram a eficiência do DEDC como sanitizante em vários alimentos, porém o DMDC não foi tão extensivamente pesquisado.

Dimetildicarbonato

O DMDC é um líquido incolor com leve odor de frutas. O ponto de ebulição é aproximadamente 172°C a 760 mmHg, e a densidade é de 1,25 a 20°C. O produto cristaliza-se a +17°C (WALLHÄUSSER, 1980).

O DMDC, quando em contato com a água, hidroliza-se rapidamente formando metanol e dióxido de carbono como principais subprodutos. A hidrólise e outras reações completam-se em menos de 24 hs após a adição do produto à água (WALLHÄUSSER, 1980; PETERSON & OUGH, 1979).



Efeitos de parâmetros físicos e químicos sobre a atividade do DMDC

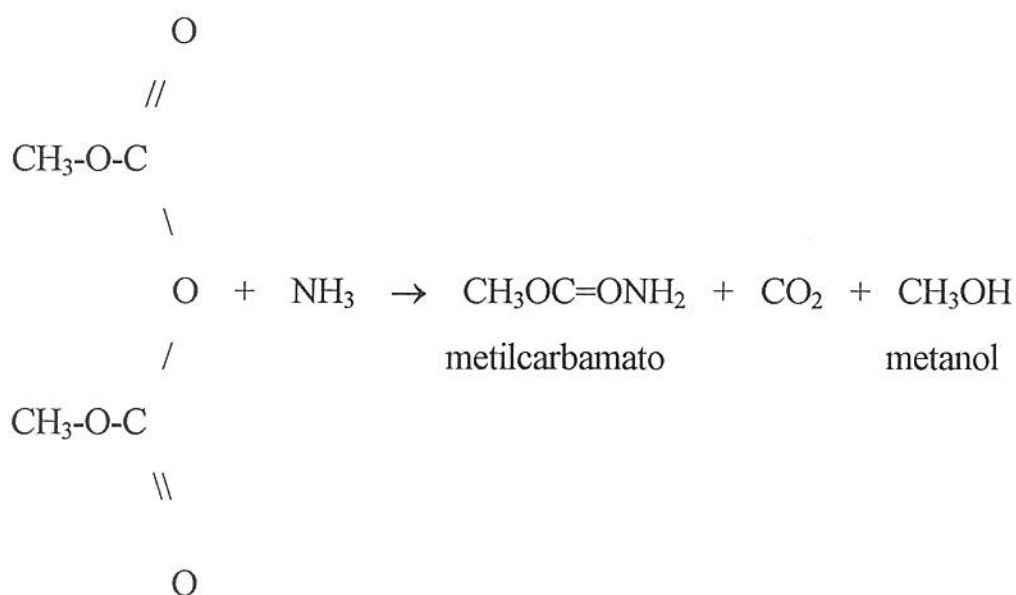
O DMDC assim como o DEDC são consideradas substâncias extremamente reativas, podendo reagir com aminas, fenóis, ácidos orgânicos e

aminoácidos. Alguns estudos mostraram que o DMDC reage com etanol e amônia com formação de pequenas quantidades de sub-produtos (PETERSON & OUGH, 1979; OUGH, 1976c).

Uma vez que os dicarbonatos tendem a decomporem-se antes do consumo de alimentos, os produtos resultantes da reação de hidrólise são importantes quando se considera seu emprego para alimentos.

A atividade do DMDC pode ser influenciada por parâmetros tais como: pH, temperatura, conteúdo alcoólico e composição do produto (OUGH, 1983; TERRELL et alii, 1993).

As reações com grupos R-NH foram descritas e dependem do grau de ionização dos grupos -NH. Na faixa de pH 3,0 a 4,0, a reação do DMDC com amônia resulta na formação de metilcarbamato (OUGH, 1976c), substância que não demonstrou qualquer atividade carcinogênica em animais de laboratório (POUND, 1967).



Segundo OUGH (1976c), a aplicação de 100mg/L de dimetildicarbonato em vinhos com $\text{pH} \leq 3,75$ e concentração de amônia $\leq 20 \text{ mg/L}$ resultou na formação de quantidades de metilcarbamato $< 10 \mu\text{g} / \text{L}$.

A taxa de hidrólise do DMDC é dependente da temperatura, ou seja, a temperaturas mais elevadas a hidrólise é mais rápida (OUGH, 1983; GENTH, 1979).

Os fornecedores recomendam que o produto seja aplicado a temperaturas ao redor de $10 - 12^\circ\text{C}$, possivelmente devido à taxa de hidrólise ser mais lenta do que a 20°C , favorecendo desta maneira uma esterilização mais eficiente.

A hidrólise total do DMDC ocorre de 4 a 6 h. após a adição do produto à água na temperatura de 20°C ; a temperaturas inferiores, o tempo para a hidrólise total é de 8 a 12 h. (PETERSON & OUGH, 1979; GENTH, 1971).

Apesar da taxa de hidrólise ser mais rápida a temperaturas elevadas, SPLITTSTOESSER & WILKISON (1973) observaram que a elevação da temperatura melhorou a eficiência do DEDC, o que resultou em aumentos de 10 a 100 vezes na taxa de destruição microbiana a 40°C quando comparada a 20°C .

TERRELL et alii (1993) avaliaram a eficiência do dimetildicarbonato (DMDC) na redução da flora de leveduras deterioradoras em sucos de fruta armazenados a temperaturas de 21 e 31°C . Verificaram que a elevação da temperatura melhorou a eficiência do DMDC e preveniu a fermentação dos sucos inoculados com níveis entre 2 a 2×10^4 células de leveduras/mL.

PORTER & OUGH (1982) relataram que com a aplicação de DMDC, a elevadas temperaturas (20 - 30°C) e concentrações alcoólicas, foi observado aumento da eficiência do produto como fungicida.

OUGH (1983) relatou que as taxas de hidrólise do DMDC e DEDC podem ser significativamente diminuídas com o aumento da concentração de etanol; outros solventes orgânicos solúveis em água podem apresentar efeito semelhante.

O DMDC, assim como o DEDC, reagem com materiais protéicos suspensos em solução, o que pode ser responsável pela redução da eficiência antimicrobiana do tratamento onde são aplicados (OUGH, 1983).

Atividade antimicrobiana do dimetildicarbonato (DMDC)

Em relação à atividade antimicrobiana, observa-se que o dimetildicarbonato (DMDC) é eficiente na inativação de diversos gêneros de bactérias, bolores e leveduras.

A eficiência antimicrobiana do DMDC é apresentada nas **Tabelas 1 e 2**.

TABELA 1. Eficácia bactericida do dimetildicarbonato (DMDC)^a

Bactérias	Concentração de DMDC ^b (mg/L)
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	80
<i>Escherichia coli</i>	400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	100
<i>Lactobacillus buchneri</i>	30
<i>Lactobacillus pastorianus</i>	300
<i>Lactobacillus brevis</i>	200
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	300
<i>Proteus mirabilis</i>	400
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	400

^a - Inóculo inicial de 5×10^2 UFC/mL; temperatura de 28°C e pH entre 2,8 e 4,7 em um meio artificial

^b - concentração 100% bactericida

Fonte: OUGH, C. S. - Dimethyldicarbonate and diethyldicarbonate. In: BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M. (Ed.) Antimicrobial in foods, cap.10, 1983.

TABELA 2. Eficácia fungicida do dimetildicarbonato (DMDC)^a

LEVEDURAS	Concentração de DMDC ^b (mg/L)
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (non-flocculating)	100
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i> (flocculating)	60
<i>Saccharomyces diastaticus</i>	200
<i>Saccharomyces oviformis</i>	100
<i>Saccharomyces bailii</i>	120
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
<i>Saccharomyces uvarum</i>	20
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	100
<i>Saccharomyces apiculatus</i>	60
<i>Saccharomyces globosum</i>	40
<i>Zygosaccharomyces priorianus</i>	75
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	50
<i>Rhodotorula glutinosa</i>	40
<i>Rhodotorula rubra</i>	200
<i>Candida krusei</i>	200
<i>Pichia membranefaciens</i>	40
<i>Pichia farinosa</i>	100
<i>Torulopsis candida</i>	100
<i>Torulopsis versatilis</i>	100
<i>Torulopsis stellata</i>	65
<i>Torula utilis</i>	240
<i>Endomyces lactis</i>	60
<i>Kloeckera apiculata</i>	40
<i>Hansenula anomala</i>	50
BOLORES	
<i>Penicillium glaucum</i>	200
<i>Byssoschlamys fulva</i>	100
<i>Botrytis cinerea</i>	100
<i>Mucor racemosus</i>	500
<i>Fusarium oxysporum</i>	100

^a - Inóculo inicial de 5×10^2 UFC/ml; temperatura 28°C e pH entre 2,8 e 4,7 em bebidas não alcoólicas

^b - concentração 100% fungicida

Fonte: OUGH, C. S. - Dimethyldicarbonate and diethyldicarbonate. In: BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M. (Ed.) Antimicrobial in foods, cap.10, 1983.

A inativação microbiana pelo emprego de DMDC e DEDC parece relacionar-se à inativação de algum sistema enzimático chave. Modificações nas proteínas, através da reação de grupos nucleofílicos com dicarbonato, podem ocorrer e o ponto de ataque é um dos átomos de carbono central. A inibição enzimática resulta de bloqueio do sítio ativo e mudanças conformacionais (OUGH, 1983).

SPLITTSTOESSER & WILKISON (1973) estudaram a velocidade de destruição microbiana com o emprego de dietildicarbonato (DEDC). Observaram que leveduras e bolores foram destruídos nos 30min. subsequentes à exposição ao produto e as bactérias lácticas, por outro lado, necessitaram de quase 24h. para sua destruição total. Estes últimos dados foram conflitantes, uma vez que à temperatura de 30°C a hidrólise do DEDC completa-se em aproximadamente 4h. e o produto não apresenta mais efeitos deletérios sobre os microrganismos.

Segundo OUGH (1983), a taxa de destruição microbiana é proporcional à concentração de DEDC utilizada. Os autores relataram que 2 horas foi o tempo necessário para a completa destruição de 50 células de leveduras/mL com a adição de 40 mg/L de DEDC, enquanto 30 minutos foram suficientes com o emprego de 120mg/L do produto.

DAUDT & OUGH (1980) encontraram resultados semelhantes aos citados acima, em testes empregando o dimetildicarbonato (DMDC). Concluíram que a concentração do produto foi o principal fator determinante da taxa de morte ou esterilização de leveduras. Além disso, descreveram que maiores níveis de DMDC foram necessários para esterilizar sucos de frutas e bebidas não alcoólicas do que para esterilizar vinhos.

Segundo SPLITTSTOESSER (1972) e SPLITTSTOESSER & WILKISON (1973), as espécies microbianas diferem consideravelmente na

resistência ao dietildicarbonato (DEDC). Enquanto 50 ppm foram suficientes para reduzir a contagem de *Sacharomyces cerevisiae* em 9 ciclos logarítmicos, a contagem de esporos de *Byssoschlamys fulva* foi reduzida em apenas 1 ciclo logarítmico com o emprego de 200 ppm de DEDC.

YANAGIDA & SUMINOE (1972) avaliaram que 100 ppm de DEDC foram necessários para a completa destruição de 10^4 a 10^6 células bacterianas existentes no vinagre. Quando o vinagre estabilizado foi reinoculado com bactérias acéticas, estas conseguiram multiplicar-se, pois o efeito esterilizante do DEDC não é mantido por longos períodos de tempo.

OUGH et alii (1978) avaliaram o efeito do pH e da concentração de etanol na eficiência do DMDC. Concluíram que a diminuição do pH e o aumento da concentração de etanol favoreceram a ação esterilizante do produto no controle da fermentação de vinhos.

SHIBASAKI & MATSUMOTO (1969) observaram que a deterioração de salsichas foi prevenida pela imersão das mesmas em solução aquosa de DEDC e observaram que as melhores condições para aplicação do produto foram: 1.000ppm de DEDC, tempo de imersão de 5 minutos, pH menor do que 5,0 e temperatura maior do que 30°C.

RIET et alii (1989) relataram que de 50 a 100mg de DMDC/L foram suficientes para controlar o crescimento vegetativo de *Byssoschlamys fulva* inoculado em suco de maçã; a temperatura de armazenamento de 30°C aumentou a eficiência do DMDC.

RIET & PINCHES (1991) observaram a redução do número de esporos de *Byssoschlamys fulva* em sucos de morango e de maçã armazenados a 30°C, após a aplicação de 50 mg de DMDC/L, a intervalos de 24 h., durante 3 dias.

Avaliaram que com este procedimento a temperatura necessária durante o processamento de suco de frutas pode ser reduzida.

SCHMIDT-LORENTZ (citado por OUGH, 1983) analisou o efeito do dietildicarbonato (DEDC) na vida-de-prateleira de carcaças de frango recém-abatidos, observando um aumento de 65% na mesma. Foram observadas reduções de 10 a 20 vezes no número de bactérias na superfície da carne.

Aplicações

O DMDC, comercialmente conhecido como Velcorin, vem sendo utilizado para a esterilização a frio de bebidas artificiais, na Alemanha, desde 1978 (GENTH, 1979; 1980). A vantagem do emprego de DMDC é que o mesmo não reage com açúcares ou adoçantes artificiais como ciclamato ou sacarina (OUGH, 1983). Na indústria farmacêutica e de cosméticos tem sido usado para a esterilização de água (WALLHÄUSSER, 1980).

Em 1988, o “Food and Drug Administration” (F.D.A.) aprovou nos Estados Unidos o emprego de dimetildicarbonato (DMDC) como agente esterilizante de vinhos, sendo permitida a concentração máxima de 200mg/l (TERRELL et alii, 1993).

O Comitê de especialistas para aditivos alimentares da FAO e Organização Mundial de Saúde-JECFA (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 1991) avaliou o emprego do dimetildicarbonato em bebidas e revisou os estudos toxicológicos sobre os níveis de metilcarbamato e metanol formados. Concluiu que a concentração de metanol resultante do emprego de DMDC em bebidas é semelhante à quantidade naturalmente presente em sucos de frutas e bebidas alcoólicas; além disso, na

presença de traços de amônia o DMDC reage formando traços de metilcarbamato. Tais substâncias, presentes em bebidas após o tratamento com DEDC, não representam riscos toxicológicos.

Em 1991, o JECFA considerou o dimetildicarbonato (DMDC) seguro para a esterilização a frio de bebidas, devendo ser usado ao nível máximo de 250mg/l.

Em 1996, EXNER et alii (BAYER, 1996) registraram, na Alemanha, uma patente relatando emprego do dimetildicarbonato em conjunto com ácido ascórbico, potássio de sorbato e benzoato de sódio para a preservação de bebidas carbonatadas e não carbonatadas.

2.3. Métodos de Avaliação Microbiológica de Carne de Aves

Os diversos tratamentos de descontaminação das carcaças ou da água de processamento visam a redução da contaminação microbiana, principalmente a eliminação de *Salmonella*.

Uma real avaliação da eficácia dos tratamentos de sanitização tem sido impedida pela falta de metodologias confiáveis e sensíveis para quantificar níveis de salmonelas nas carcaças antes e depois dos tratamentos, uma vez que o número de salmonelas que naturalmente contaminam as carcaças de frango é imprevisível (MORRISON & FLEET, 1985).

Grandes números de células de *Salmonella* são facilmente detectados através de vários procedimentos, mas, quando em número baixo, não são detectados pelos métodos em uso (COX & BLANKESHIP, 1975; COX, 1988); isto é importante porque é possível que determinados tratamentos com agentes

descontaminantes possam trazer os níveis de *Salmonella* abaixo da sensibilidade dos métodos existentes, o que conseqüentemente levaria a conclusões errôneas.

O método de amostragem é um passo crítico e determina o sucesso ou insucesso da técnica empregada para recuperar microrganismos, principalmente *Salmonella* de carcaças de aves (COX & BLANKESHIP, 1975; COX et alii, 1978; COX et alii, 1981).

As técnicas mais comumente empregadas para o preparo da amostra envolvem: lavagem total ou maceração da carcaça; incubação da carcaça com diluente; “swab” de uma ou mais áreas da pele; lavagem de partes; lavagem ou homogeneização de pedaços de tecidos (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, 1980).

O método de lavagem total tem recebido grande aceitação para a amostragem de carcaças de aves. Entretanto, a remoção das células de *Salmonella* da superfície da carcaça, pelo emprego desse método, é discutível (JETTON et alii, 1992; LILLARD, 1988; LILLARD, 1989).

Os procedimentos de amostragem que alteram significativamente a integridade física da carcaça, ou resultam em seu contato com substâncias adulteradoras, são considerados destrutivos, como por exemplo maceração e lavagem da carcaça inteira, ou incubação da carcaça toda em caldo lactosado. As técnicas não destrutivas incluem: “swabing” de uma ou mais áreas na superfície ou na cavidade visceral, lavagem que não adultera as carcaças e lavagem ou homogeneização de pedaços do tecido que quando retirados não afetam a aparência ou o peso das carcaças (COX & BLANKESHIP, 1975; COX et alii, 1978; JETTON et alii, 1992; FLOWERS, 1985).

COX & BLANKESHIP (1975) descreveram um método de amostragem no qual uma carcaça inteira foi incubada em caldo lactosado para o pré-enriquecimento. O emprego deste método resultou na destruição completa da

carcaça e da ocupação de grande espaço no incubador, mas concluíram ser o método mais sensível para detectar *Salmonella* em carcaça de aves.

BLANKENSHIP & COX (1976) descreveram um método não destrutivo que pode ser usado na própria planta de processamento; as carcaças foram lavadas com 500 mL de água estéril e esta foi removida para frasco apropriado ao qual foi adicionado caldo lactosado desidratado, para o pré-enriquecimento; o método mostrou ser sensível para detecção de pequenos números de salmonelas em carcaças de frangos contaminados experimentalmente.

NOTERMANS et alii (1975) estudaram a influência do congelamento e descongelamento na ligação dos microrganismos à pele de frangos, empregando um organismo indicador, inoculado antes do congelamento. Demonstraram que é possível obter a contagem total e a contagem de enterobactérias pela amostragem da água de descongelamento, empregando um método não destrutivo. Porém, o método de lavagem total da carcaça que foi realizado comparativamente, ainda foi considerado como o melhor método de amostragem.

COX et alii (1978) compararam o método de amostragem destrutivo - incubação da carcaça toda com o líquido de lavagem - com o método não destrutivo - incubação da água de lavagem da carcaça com caldo lactosado desidratado. Concluíram não haver diferença entre a porcentagem de carcaças positivas para *Salmonella*, obtidas pelos dois métodos.

COX et alii (1978) compararam também três métodos de amostragem: lavagem total da carcaça, lavagem da pele do pescoço e maceração da pele do pescoço, para detecção de *Salmonella*, e concluíram não haver diferenças significativas entre os resultados obtidos pelas duas últimas técnicas. Entretanto, com o método de lavagem total da carcaça, 45% das carcaças foram positivas para a presença de *Salmonella*, enquanto 11% e 12% foram positivas para *Salmonella*

quando os métodos utilizados foram lavagem e maceração da pele do pescoço, respectivamente.

COX et alii (1981) estudaram um método de lavagem total da carcaça, quando apenas 100 mL da água de lavagem foi utilizada; concluíram que esse volume foi adequado para recuperar diferentes cepas de *Salmonella* inoculadas artificialmente nas carcaças. Segundo os autores, esta técnica apresenta vantagens, pois são necessários menor volume de meio e menos espaço no incubador; além disso, maiores concentrações de células foram obtidas no meio de enriquecimento seletivo e, portanto, as chances de detectar *Salmonella* no passo de plaqueamento seletivo foram também maiores.

HAWA et alii (1984) descreveram um método rápido para enumerar *Salmonella* em carcaças de frango. As carcaças foram colocadas em um saco plástico com 300 mL de água peptonada tamponada e massageadas por 2 min. A água de lavagem foi transferida para tubos de centrífuga que foram incubados por 2 horas a 20°C, após o qual foram centrifugados por 15 min para sedimentar as células microbianas. O precipitado de células foi inoculado em meio de ágar dulcitol bile novobiocina; para a confirmação bioquímica das colônias presuntivas foi utilizado o teste de ONPG e descarboxilação da lisina. A presença de *Salmonella* foi confirmada em 48 horas. Concluíram que com este método as contagens foram significativamente mais altas do que aquelas encontradas pelo procedimento convencional.

DICKENS et alii (1985) testaram um aparelho agitador para lavagem das carcaças de frango, visando padronizar os movimentos e as turbulências em comparação ao método de lavagem manual. Não encontraram diferenças na contagem total em placas, na contagem de enterobactérias e na recuperação de *Salmonella* com ambos procedimentos.

LILLARD (1988) avaliou três métodos de amostragem de carcaças - lavagem total da carcaças, pedaços de pele triturados e maceração de pedaços de pele. Os tres métodos apresentaram resultados similares quanto ao número de enterobactérias e contagem total, porém foi possível recuperar apenas uma pequena porcentagem das bactérias presentes. Concluíram que grandes números de bactérias podem ainda ser recuperadas após 40 lavagens de uma mesma carcaça; o aumento do número de lavagens depois que a bactéria esteja firmemente ligada não resulta em benefícios na qualidade bacteriana geral e na remoção de *Salmonella* das carcaças.

TSAI et alii (1991) propuseram a utilização de membrana de nitrocelulose para remover células de salmonela ligadas à superfície das carcaças. A membrana foi incubada a 37°C por 18 horas e, em seguida, aplicada coloração imunológica, resultando na identificação de salmonelas em menos de 24 h. O método mostrou-se mais sensível que as técnicas de "swab" e lavagem empregadas.

BAUTISTA et alii (1994) avaliaram a eficiência do método de ATP - bioluminescência na determinação dos níveis microbianos nos tanque de escalda e de resfriamento. Mostraram que este método oferece resultados comparáveis aos obtidos com a contagem em placas.

Diversos métodos rápidos têm sido propostos (HAWA et alii, 1984; HOLBROOK et alii, 1989) para detectar *Salmonella* spp: membrana hidrófoba (ENTIS, 1985; ENTIS & BOLESZCZUK, 1991; ENTIS et alii, 1982), técnica de hibridização de DNA (FITTS, 1983), métodos imunoenzimáticos (FLOWERS et alii, 1986; MINNICH, 1982), técnica de anticorpos fluorescentes (SILLIKER, 1966) e meios de motilidade (HOLBROOK et alii, 1989; ZUTTER, 1991).

2.4. Processamento industrial de carne de frangos

O processamento industrial de abate de aves pode ser dividido nas seguintes etapas: recepção, atordoamento, sangria, escaldagem, depenagem, escaldagem dos pés e das cutículas, evisceração, lavagem final, resfriamento, gotejamento, embalagem, armazenamento e aproveitamento dos subprodutos (BASSOI, 1994; BERAQUET, 1994).

A Figura 2 ilustra o fluxograma de abate de aves.

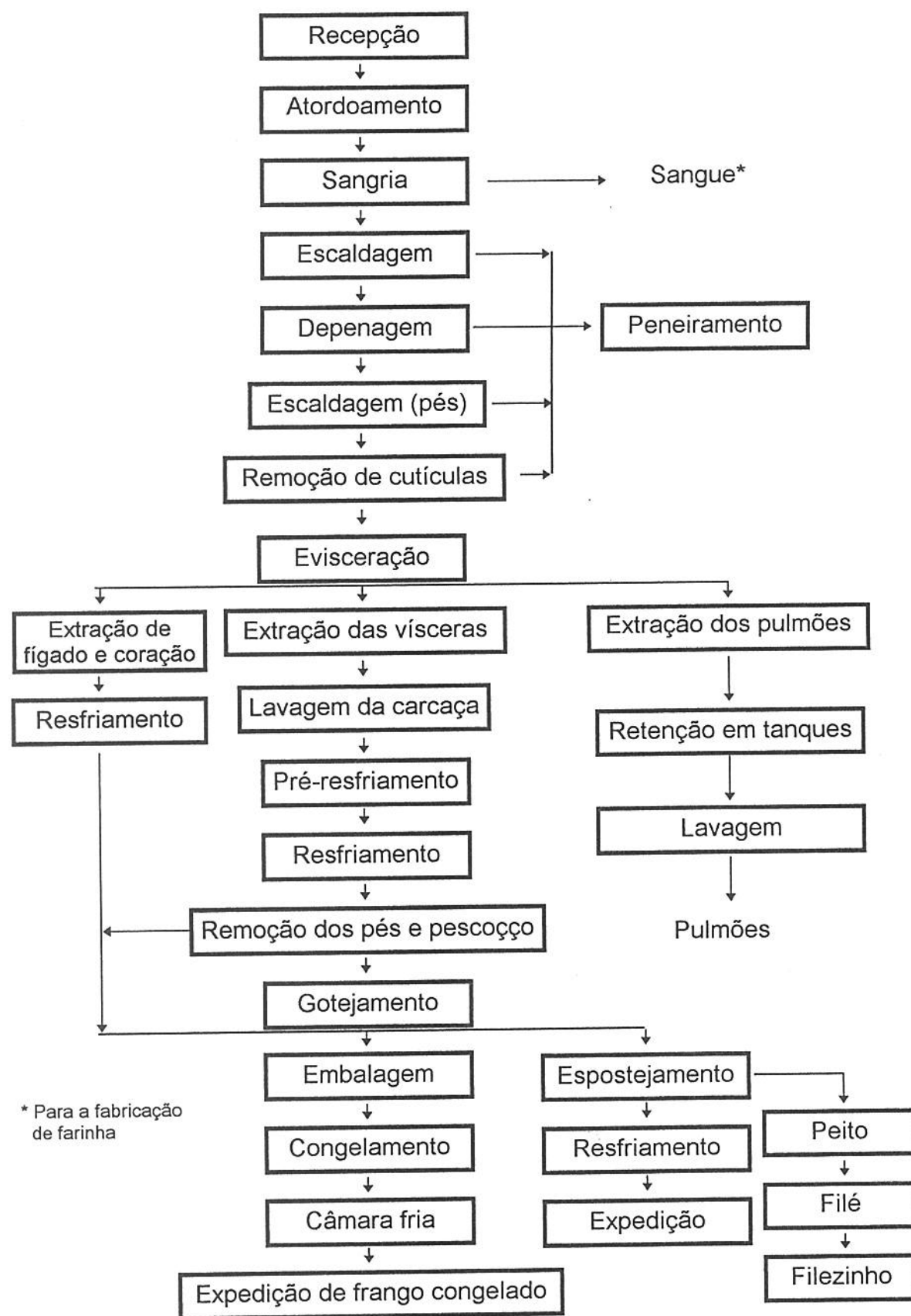


FIGURA 2. Fluxograma do abate de aves

APINCO, 1994. p.1-12.

a) Recepção

As aves chegam ao abatedouro transportadas por caminhões - dentro de gaiolas próprias para este fim, com capacidades de alojar 15 a 20 aves em média.

A área de recepção não é destinada a um período de permanência muito extenso. Entretanto, devido às flutuações que podem ocorrer no sistema de entrega, as aves eventualmente ficam estacionadas nesta área durante algumas horas. Portanto, ela é provida de ventiladores e chuveiros, para minimizar a mortalidade. As aves doentes ou mortas são separadas para a produção de farinha, juntamente com os outros subprodutos. Ao final do processo, esta área é lavada.

b) Atordoamento

As aves são presas pelos pés no transportador aéreo para o atordoamento, que consiste na aplicação de choque elétrico (70 V) na região da cabeça, que imobiliza a ave e facilita o relaxamento muscular, permitindo a extração de maior quantidade de sangue.

O atordoador comumente usado contém um líquido, geralmente salmoura, para transmitir uma corrente elétrica até a cabeça das aves suspensas na nória. O tempo de atordoamento é de aproximadamente 7 segundos. Diferentes tipos de atordoadores estão disponíveis. Um tipo padrão com corrente alternada opera com frequência de 60 Hz, enquanto o de alta frequência usa 400 Hz. Atordoadores de corrente contínua são de alta voltagem e usam 100 V. Para corrente alternada recomenda-se 50 V e para corrente contínua, recomenda-se 90 V.

c) Sangria

As aves são sangradas através do seccionamento da veia jugular, e passam por um túnel onde o sangue é captado em canaletas e conduzido a recipientes coletadores.

A recuperação do sangue é prática comum nos abatedouros, sendo encaminhado às instalações de fabricação de farinha.

Terminando o abate, a área de recolhimento do sangue é lavada e a água da lavagem é encaminhada ao sistema de esgotos.

O sangramento das carcaças deve ser completo, para assegurar que as aves não estejam respirando ao entrar no tanque de escaldamento. Isto evita a entrada de água nos pulmões e previne a contaminação do produto. O tempo recomendado de sangramento varia de 55 a 100 segundos, dependendo dos efeitos e do tempo de atordoamento até à sangria, bem como do tipo de corte efetuado.

d) Escaldagem

Após a sangria, as aves são imersas em um tanque com água quente. A escaldagem, que pode ser considerada como a primeira operação de lavagem das aves, visa remover impurezas e o sangue da superfície externa e, principalmente, facilitar a retirada das penas - variáveis fundamentais no que concerne à qualidade e aparência do produto. A água de escaldagem é mantida à temperatura desejável pela

adição contínua de água quente, o que resulta num efluente líquido contínuo desta área.

Geralmente, utilizam-se temperaturas de escaldamento de 52 a 54°C. O tempo de escaldamento varia entre 1 ½ a 2 ½ minutos, dependendo da temperatura.

Escaldadores de pescoço geralmente operam entre 60 e 65°C; o de asas entre 54 e 60°C.

No escaldamento, é importante que a temperatura da água seja constante em todo o comprimento do tanque.

Uma temperatura muito alta causará a remoção da camada externa da epiderme, conferindo coloração desuniforme à pele. Isso se deve à perda de umidade e resulta numa área brilhante com perímetro marrom.

A 54°C, o avermelhamento aumenta nos folículos das penas, prejudicando a aparência. Uma temperatura muito alta tende a aquecer os músculos da superfície, especialmente na área do peito, causando encolhimento e endurecimento.

e) Depenagem

Após escaldamento, as aves entram numa série de máquinas de depenagem. Essas máquinas são desenhadas para depenar asas, pernas, pescoço e corpo, através de uma série de tambores com dedos de borracha pequenos e firmes.

Na parte final, os tambores têm dedos mais longos e flexíveis, que permitem uma ação mais suave. Geralmente, três ou quatro depenadores são usados

em sequência, seguidos por um depenador para remoção das penas da coxa, da asa e do pescoço.

Os depenadores devem ser posicionados próximos aos escaldadores, de maneira que a temperatura da pele não diminua muito entre uma operação e outra.

O ajuste dos dedos deve ser feito de modo a evitar a abrasão da pele ou mesmo a quebra das asas.

f) Evisceração

As aves são evisceradas e preparadas para consumo pela remoção da cabeça, vísceras, pés, papo e pulmões da carcaça depenada. Na linha de evisceração existem variações quanto ao local de remoção da cabeça - com ou sem pescoço - e dos pés.

A evisceração compreende as seguintes operações:

- Abertura do abdômen;
- Exposição das vísceras;
- Retirada das vísceras abdominais;
- Retirada dos pulmões
- Separação dos miúdos.
- Extração da cloaca: na remoção mecânica, corta-se ao redor da cloaca com uma lâmina rotatória. Em equipamento com vácuo, é feita a evacuação

do intestino grosso. Esse tipo de máquina ajuda a evitar a contaminação fecal. No método manual, o operador segura a cloaca entre os dedos indicador e polegar e faz dois cortes transversais próximos a ela, de tal forma que o intestino possa ser retirado até 1/3 do comprimento do dorso. Falhas nessa operação podem causar contaminação fecal nas aves.

- Abertura do abdômen: é feita uma incisão próxima à cloaca, para permitir a remoção das vísceras; na abertura automática a incisão é feita longitudinalmente.

- Eventração (exposição das vísceras): essa operação pode ser executada manual ou mecanicamente. Se feita manualmente, a mão é cuidadosamente introduzida na cavidade abdominal, para não desprender a gordura cavitária. Os dedos indicador e médio são usados para segurar firmemente a moela. Gira-se a mão, puxando a moela e arrastando as vísceras para fora. As vísceras, ainda ligadas à carcaça, ficam dispostas em um dos lados da cauda na forma requerida pela inspeção. A remoção mecanizada das vísceras é feita de maneira sincronizada com a velocidade da linha. Cada ave é seguramente posicionada e um mecanismo - com a forma de colher, ou mão espalmada - entra na cavidade abdominal e retira as vísceras. Geralmente, os pulmões e o papo são removidos. Um ajuste na máquina é necessário para evitar a perda de gordura abdominal e danos ao fígado, com o rompimento da vesícula biliar.

- Inspeção: é feita sob supervisão do Serviço de Inspeção Federal (SIF), que determina se a ave é sadia ou se necessita de remoção de partes com injúrias, ossos quebrados, ou a retirada total da linha, em caso de doenças.

- Retirada das vísceras (miúdos): depois que as carcaças são inspecionadas e julgadas sadias, coração, fígado e moela são removidos das vísceras; deve-se evitar o rompimento da vesícula biliar e a contaminação do fígado nessa operação. O saco pericardeal é removido do coração. O coração e o fígado

são encaminhados para um resfriador. As moelas são abertas, lavadas internamente e têm a cutícula removida.

- Extração dos pulmões: os pulmões são removidos por pistolas a vácuo operada manualmente. Com a remoção automática das vísceras, cerca de 90% dos pulmões são cuidadosamente removidos.

- Lavagem externa e interna: a lavagem final das carcaças - feita externamente com chuveiro e internamente com equipamento tipo pistola - visa a remoção de materiais estranhos, como sangue, membranas, fragmentos de vísceras etc.

g) Resfriamento

Uma vez completa a etapa de evisceração, as carcaças desligam-se dos ganchos transportadores, caindo em um tanque, aberto, onde é feito um pré-resfriamento. As carcaças são transportados através de esteira e o tanque aberto é descarregado após cada período de abate.

Saindo do tanque aberto, as carcaças entram em outro tanque (Chiller), para completar o resfriamento iniciado no pré-Chiller.

Há vários métodos de resfriamento das aves. O mais comum é a imersão das carcaças em tanques longos com uma mistura de água e gelo fundente, ou reversão com camisa que permita a passagem de um líquido refrigerante, como o etilenoglicol. O resfriamento das aves consiste numa operação de dois estágios.

O primeiro estágio é utilizado para baixar lentamente a temperatura da carcaça, para evitar a rápida contração das fibras musculares, que ocasiona

endurecimento da carne na cocção. Também esse primeiro estágio remove qualquer traço de material estranho remanescente após a lavagem final. A água desse pré-resfriamento deve estar na faixa de 10 a 18°C, e conter água proveniente do excesso de água do resfriador. O tempo para esse pré-resfriamento representa é 1/3 da metade do tempo total de resfriamento. O Serviço de Inspeção Federal (SIF) exige que a temperatura da água, nesse pré-resfriamento, não ultrapasse 20°C.

O segundo estágio, ou resfriamento final, é feito em equipamento similar ao pré-resfriador, que mantém a temperatura da água entre 0 e 1°C. A temperatura da carcaça ao sair do resfriador deve estar entre 2 e 4°C. O SIF estipula 8°C, como máxima para carcaças comercializadas sob refrigeração, e 12°C, para aquelas comercializadas sob congelamento.

h) Gotejamento

Após o resfriamento, as carcaças são suspensas pelo pescoço ou asas para escoamento da água aderida, antes de sua embalagem. O comprimento da linha de gotejamento está relacionado ao tempo necessário para drenar a água das carcaças, estando geralmente entre 2 ½ a 4 minutos.

Após o gotejamento, as carcaças são removidas do transportador para uma mesa de aço inoxidável, onde as vísceras comestíveis e os pés pré-resfriados anteriormente serão anexados a elas, para posterior embalagem em sacos plásticos. As aves poderão ainda ser enviadas para espostejamento da carcaça e embalagem.

i) Embalagem e armazenamento

Uma vez resfriadas, as carcaças submetem-se à pesagem e logo são embaladas em sacos plásticos e encaminhadas para câmaras frias, aguardando expedição.

Da mesma forma que na “área suja”, a água utilizada nas operações da “área limpa”, é recolhida em canaletas secundárias ligadas a uma canaleta principal, que a conduz ao separador de vísceras. Os sistemas utilizados para recuperação das vísceras são os mesmos descritos para a recuperação de penas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Matéria-prima

- Carcaças de frango, livres de vísceras, cabeça e pés, foram coletados ao final do banho de resfriamento. (Figura 2)

- Peitos de frango com pele e osso foram coletados no espostejamento, cuja temperatura ambiente era 12°C. Filezinhos de peito de frango, preparados separadamente para os experimentos, foram obtidos de acordo com fluxograma (Figura 2), em sala à temperatura de 12 °C.

A matéria-prima foi cedida sempre pelo mesmo abatedouro e transportada em isopor com gelo para o laboratório.

- Dimetildicarbonato (DMDC) - Velcorin, produzido pela Bayer, concentração de 100% mantido à temperatura de 17°C.

3.1.2. Equipamentos e Vidrarias

Estufa bacteriológica marca Fanem

Estufa incubadora para B.O.D., modelo 347.D, marca Fanem

Balança semi-analítica, marca Mettler Toledo
Sistema de filtração, marca Millipore
Membranas de celulose, marca Millipore
Refrigerador Brastemp
Autoclave, marca Phoenix
Forno de esterilização, marca Fanem
Agitador de peneiras para análises granulométricas marca Produtest
Contador de colônias, marca Fanem
Caixa plástica retangular, medindo 25 x 15 x 15 cm
Balde plástico redondo com diâmetro de 18 cm
Aparelho portátil Minolta Croma Meter CR 200b
Potenciômetro portátil Ingold Mod. WTW pH 91
Tubos e placas de Petri, marca Pyrex
Cabo de Kölle e fio de níquel-cromo
Triturador de alimentos

3.1.3. Meios de cultura e Diluentes

- “Brain Heart Infusion”, Peptona Bacteriológica, Ágar padrão para contagem (P.C.A.) e Caldo simples, todos da marca DIFCO.
- Ágar Salmonella-Shigella, Ágar verde-brilhante, Caldo selenito-cistina e Caldo Rappaport-Vassiliadis, todos da marca DIFCO e padronizados.
- Soros polivalentes somático e flagelar, cedidos pelo Instituto Adolfo Lutz.

3.1.4. Reagentes químicos

Nas determinações químicas foram utilizados reagentes de grau analítico, das marcas Aldrich e Sigma.

3.2. Métodos

3.2.1. Eficiência da solução de dimetildicarbonato (DMDC) utilizada como sanitizante.

A avaliação da eficiência da solução de dimetildicarbonato (DMDC) contra bactérias patogênicas e deterioradoras foi realizada pela aplicação do produto de acordo com especificações do fabricante. Foram utilizadas culturas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, gentilmente cedidas pelo laboratório de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

Para o teste, as culturas foram repicadas para caldo BHI contido em tubos, sendo incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 horas. Em seguida, 0,1 mL das suspensões das bactérias, contendo aproximadamente 10^7 a 10^8 células/mL foi adicionado a 1 litro de salina estéril, resultando em soluções com aproximadamente 10^3 UFC/mL. Neste recipiente foi adicionado o volume de DMDC necessário para atingir os níveis recomendados de 100 , 100 e 400 ppm para a esterilização de culturas de *S.aureus*, *Pseudomonas spp.* e *E. coli* , respectivamente. Os níveis da

DMDC empregados nos testes foram recomendados como a mínima concentração letal.

Após 4 e 6 horas de contato à 25°C, uma alíquota de 1 mL dessa suspensão foi diluída em água peptonada tamponada 0,1% (p/v) até a diluição 10^{-6} ; todas as diluições foram plaqueadas pelo método de “pour-plate” utilizando-se P.C.A.. Um teste controle, ao qual não foi adicionado DMDC, foi realizado em paralelo.

3.2.2. Eficiência da solução de dimetildicarbonato (DMDC) na inativação de *Salmonella enteritidis* PT 4.

A cepa padrão de *Salmonella enteritidis* CPHL-PT4 (Center Public Health Laboratories - fagotipo 4), foi gentilmente cedida pela Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, sendo mantida em ágar gelose.

Para esse teste, a cultura foi repicada para caldo simples com incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas, até atingir densidade de 10^8 a 10^9 UFC/mL. A partir deste foram feitas diluições decimais seriadas, em duplicata, em solução salina contendo 1% de tween 80 até obtenção das concentrações aproximadas de células de: 100, 50, 25, 10 e 5 UFC / 10 mL. O volume de DMDC foi adicionado para atingir a concentração de 4.500 ppm em uma série de tubos, sendo os mesmos agitados vigorosamente; a outra série foi utilizada como controle aos quais não foi adicionado o produto. Os tubos foram estocados sob refrigeração a 7°C por 10 a 12 horas. O volume total de cada tubo - 10 mL - foi filtrado através de membrana de 47 mm de diâmetro e poros de $0,45\mu$.

Para a enumeração do inóculo controle, as membranas foram transferidas assepticamente para a superfície de placas de ágar Salmonella-Shigella: estas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por 24-48 horas. Foi feita a contagem de colônias suspeitas e uma porcentagem destas foi testada bioquimicamente em meio presuntivo para enterobactérias - IAL (PESSOA & SILVA, 1972; RUGAI & ARAUJO, 1968). A confirmação foi realizada por sorologia, empregando-se soro polivalente somático e flagelar.

Para a avaliação da sobrevivência do inóculo tratado com DMDC, as membranas foram transferidas individualmente para 125 mL de água peptonada tamponada 1% e a seguir foi utilizado o procedimento para pesquisa de *Salmonella* descrito no item 3.2.6.3.

3.2.3. Sanitização de carcaças e partes de frango pelo emprego de dimetildicarbonato (DMDC).

Para avaliar a eficiência do DMDC como sanitizante da superfície de carcaças e partes de frango realizaram-se quatro ensaios preliminares. Estas foram submetidas a tratamentos com soluções de DMDC a concentrações de 25.500 ppm, 5.000 ppm e 2.000 ppm, variando-se os tempos de imersão de 10 a 60 segundos, dependendo do teste. Os níveis de DMDC foram escolhidos para os ensaios preliminares, pois não existem na literatura dados a respeito da concentração apropriada para carne de aves.

No início dos estudos empregaram-se carcaças de frango inteiras, passando-se em seguida a utilizar-se peito com osso e finalmente filezinhos de peito. Estes últimos adaptavam-se melhor ao experimento, pela facilidade de transporte e armazenamento.

No primeiro ensaio, carcaças de frango inteiras foram submetidas ao tratamento de imersão em solução a 25.500 ppm de DMDC. No segundo ensaio, peitos de frango com pele e osso foram submetidos ao tratamento de imersão em solução a 5.000 ppm de DMDC por diferentes tempos. No terceiro ensaio, peitos de frango com pele e osso foram submetidos ao tratamento de imersão em solução a 2.000 ppm de DMDC por diferentes tempos. No quarto ensaio, filezinhos de peito de frango foram submetidos ao tratamento de imersão em solução a 5.000 ppm de DMDC por diferentes tempos. Em todos os ensaios foram realizados os controles pertinentes. Cada ensaio será descrito detalhadamente a seguir.

As soluções de dimetildicarbonato foram preparadas imediatamente antes de cada ensaio, adicionando-se o volume do produto puro necessário para atingir as concentrações desejadas, a água destilada à temperatura de 17° e em volumes suficientes para submergir as carcaças ou as partes de frango; o DMDC foi dissolvido sob lenta agitação. Recipientes plásticos foram empregados para a imersão das carcaças ou partes de frango nos tratamentos de imersão.

Os testes com o agente sanitizante foram realizados em sala refrigerada, com temperatura de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2.3.1. Ensaio I

Neste ensaio foram empregadas 6 carcaças, divididas aleatoriamente em dois grupos iguais. Um grupo foi submetido ao tratamento de imersão por 10 segundos na solução de DMDC a 25.500 ppm e o outro grupo, que não recebeu tratamento algum, foi utilizado como controle. Uma carcaça de cada grupo foi submetida à análise microbiológica a cada 7 dias durante o tempo de estocagem.

A solução utilizada como sanitizante foi preparada pela adição de 2,55% de DMDC (v/v) a água destilada a 17°C. Para a imersão de cada carcaça individualmente, novas soluções de DMDC foram preparadas.

Após os tratamentos, as carcaças foram colocadas para gotejar e embaladas em sacos de polietileno de onde foi retirado o excesso de ar. Foram resfriadas como em um processamento normal e estocadas sob refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.3.2. Ensaio II

Para o ensaio II, foram empregados 36 peitos de frango com pele e osso, divididos aleatoriamente em quatro grupos iguais. Três grupos foram submetidos ao tratamento de imersão na solução de DMDC a 5.000 ppm pelos tempos: 30, 45 e 60 segundos; o outro grupo, que não recebeu tratamento algum, foi utilizado como controle. Três peitos de cada grupo foram submetidos à análise microbiológica a cada 7 dias durante o tempo de estocagem.

A solução utilizada como sanitizante foi preparada pela adição de 0.5% de DMDC (v/v) a água destilada a 17°C. Para cada grupo de quatro peitos imersos simultaneamente, novas soluções de DMDC foram preparadas.

Após os tratamentos, as condições de embalagem e estocagem foram semelhantes às observadas no ensaio I.

3.2.3.3. Ensaio III

O ensaio III foi realizado com 36 peitos de frango com pele e osso, divididos aleatoriamente em quatro grupos iguais. Três grupos foram submetidos ao tratamento de imersão na solução de DMDC a 2.000 ppm pelos tempos: 15, 30 e 60 segundos; o outro grupo, que não recebeu tratamento algum, foi utilizado como controle. Três peitos de cada grupo foram submetidos à análise microbiológica a cada 7 dias durante o tempo de estocagem.

A solução utilizada como sanitizante foi preparada pela adição de 0,2% de DMDC (v/v) à água destilada a 17°C. Para cada grupo de quatro peitos imersos simultaneamente, novas soluções de DMDC foram preparadas.

Após os tratamentos, as condições de embalagem e estocagem foram semelhantes às observadas nos ensaios anteriores.

3.2.3.4. Ensaio IV

Neste ensaio foram utilizados 36 filezinhos de peito de frango, divididos aleatoriamente em três grupos iguais. Dois grupos foram submetidos ao tratamento de imersão na solução de DMDC a 5.000 ppm pelos tempos de: 30 e 60 segundos; o outro grupo, que não recebeu tratamento algum, foi utilizado como controle. Quatro filezinhos de cada grupo foram submetidos à análise microbiológica a cada 7 dias durante o tempo de estocagem.

A solução utilizada como sanitizante foi preparada pela adição de 0,5 % de DMDC à água destilada, à temperatura de 17°C. Para cada grupo de quatro peitos imersos simultaneamente, novas soluções de DMDC foram preparadas.

Após os tratamentos, as condições de embalagem e estocagem foram semelhantes às observadas nos ensaios anteriores.

3.2.4. Determinação da vida-de-prateleira de carcaças ou partes de frango, submetidas a tratamentos de imersão na solução de dimetildicarbonato.

As amostras foram submetidas a análises microbiológicas para a caracterização do nível de contaminação após um dia de estocagem a 4°C, através da contagem total de bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas.

Após os tratamentos as amostras foram estocadas sob refrigeração a 4°C e submetidas a análises microbiológicas a cada sete dias de estocagem, visando observar possíveis reduções nas contagens microbianas.

3.2.4.1. Análise microbiológica

a) Método de enxaguadura com esmagamento

Foi empregado o procedimento descrito por MORRISON & FLEET (1985), para o preparo da amostra para análise.

As carcaças, peito com osso e os filezinhos foram pesados e transferidos assepticamente para saco de polietileno, ao qual foram adicionados, respectivamente, os volumes de 300 mL, 120 mL e 60 mL de salina peptonada estéril. Foram massageados e agitados vigorosamente por 2 minutos e a água de lavagem transferida para frasco estéril de boca larga.

b) Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios ou anaeróbios facultativos.

A partir da suspensão de lavagem inicial prepararam-se diluições decimais de 10^{-1} até a diluição necessária, utilizando-se tubos com 9,0 mL de salina peptonada estéril (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

Para semeadura foi empregada a técnica de "pour-plate", utilizando-se o meio para contagem total. As placas foram incubadas a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, após o que foi feita a contagem como recomendado por INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (1988).

3.2.5. Otimização de tempo de imersão e concentração de dimetildicarbonato (DMDC) no tratamento de filezinhos de peito de frango

Para cada concentração e tempos de imersão na solução de DMDC testados no item 3.2.3., foi realizada a contagem de bactérias aeróbias mesófilas, após o armazenamento a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$. A contagem microbiana foi escolhida, porque é o

parâmetro que indica se o produto apresenta-se deteriorado ou não, o que reflete-se neste caso, na vida-de-prateleira da carne de frango refrigerada.

Com base nos resultados obtidos, foi realizado este experimento, onde variaram-se os níveis de DMDC e os tempos de imersão dos filezinhos na solução aquosa do produto, obtendo-se as contagens microbianas durante a estocagem a 4°C de filezinho de peito de frango refrigerado.

Os testes foram realizados em sala refrigerada com temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Após os tratamentos, os filezinhos foram colocados para gotejar e embalados em sacos de polietileno de onde foi retirado o excesso de ar. Foram resfriados como em um processamento normal de fábrica e estocados sob refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para o processo de otimização do tempo de imersão e concentração de DMDC, este experimento foi delineado estatisticamente, empregando-se a metodologia Superfície de resposta, visando avaliar o efeito combinado de duas variáveis independentes: concentração de DMDC e tempo de imersão na solução, na vida-de-prateleira de filezinho de peito de frango refrigerado.

Cada variável foi examinada em cinco níveis diferentes, codificados como: -2, -1, 0, 1, 2. O valor das variáveis codificadas e os valores originais para o experimento são mostrados na **Tabela 3**.

TABELA 3. Delineamento estatístico para otimização do tempo de imersão e concentração de DMDC no tratamento de filezinho de peito de frango

Amostra	Concentração de DMDC	Tempo de imersão	Tempo de estocagem	Concentração de DMDC	Tempo de imersão	Tempo de estocagem
	X_1	X_2	X_3	X_1 (ppm)	X_2 (seg.)	X_3 (dia)
Valores codificados				Valores reais		
1	-2	-2	-2	0	15	1
2	-1	-1	-1	1500	30	5
3	0	0	0	3000	45	9
4	1	1	1	4500	60	13
5	2	2	2	6000	75	17

Considerando-se estas variáveis experimentais, o planejamento foi composto de 17 combinações, sendo 14 combinações diferentes e 3 repetições do ponto central, conforme planejamento experimental proposto na **Tabela 4**.

Os primeiros oito ensaios correspondem a um fatorial 2^3 . Os próximos seis ensaios formam um planejamento de estrela. O ponto central em triplicata corresponde aos tres últimos ensaios. Foram escolhidos níveis de -2 e 2 , ao invés de -1,68 e 1,68, normalmente usados para este tipo de planejamento.

TABELA 4. Delineamento experimental com combinações das variáveis em estudo.

Tratamento	Concentração de DMDC X_1 (ppm)	Tempo de imersão X_2 (seg.)	Tempo de estocagem X_3 (dias)
1	1500	30	5
2	4500	30	5
3	1500	60	5
4	4500	60	5
5	1500	30	13
6	4500	30	13
7	1500	60	13
8	4500	60	13
9	0	45	9
10	6000	45	9
11	3000	15	9
12	3000	75	9
13	3000	45	1
14	3000	45	17
15	3000	45	9
16	3000	45	9
17	3000	45	9

3.2.5.1. Análise microbiológica

Antes dos tratamentos, o nível inicial de contaminação dos filezinhos de peito de frango foi monitorado pela contagem total de bactérias mesófilas.

A eficiência dos tratamentos com diferentes concentrações de DMDC e tempos de imersão na solução do sanitizante foi monitorada pela contagem total de bactérias mesófilas em filezinho de peito de frango estocado à 4°C, após os tratamentos.

Foram analisados cinco filezinhos em cada um dos pontos experimentais. Desta forma a influência das variações individuais foi minimizada e as conclusões sobre o efeito do tratamento com DMDC, na contagem de bactérias mesófilas, foram mais precisos. (4 pontos foram excluídos, devido à problemas de laboratório).

a) Método de enxaguadura com esmagamento

Foi empregado o procedimento descrito por MORRISON & FLEET (1985) no preparo da amostra para análise.

Os filezinhos foram pesados e transferidos assepticamente para saco de polietileno, ao qual foi adicionado 60 mL de solução salina peptonada estéril. Foram massageados e agitados vigorosamente por 2 minutos e a água de lavagem transferida para frasco estéril de boca larga.

b) Contagem total de microrganismos mesófilos aeróbios ou anaeróbios facultativos.

A partir da suspensão de lavagem inicial prepararam-se diluições decimais de 10^{-1} até a diluição necessária, utilizando-se tubos com 9,0 mL de solução salina peptonada estéril (VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1992).

Para semeadura foi empregada a técnica de "pour-plate", utilizando-se o meio para contagem total. As placas foram incubadas a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, após o que foi feita a contagem como recomendado por INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (1988).

3.2.5.2 Análise Estatística

Os dados obtidos no estudo foram tratados por análise de regressão múltipla para equação de superfície de resposta de 2ª ordem, que contém termos lineares e quadráticos. Um modelo polinomial de 2ª ordem foi proposto, porém, como não atendia a suposição de normalidade dos resíduos, foi utilizada a transformação dos dados, de acordo com a transformação de BOX-COX (BOX et alii, 1978). As análises estatísticas e a representação gráfica foram realizadas no SAS, versão 6.04.

3.2.6. Avaliação da ação do dimetildicarbonato (DMDC) em *Salmonella enteritidis* PT4 inoculada laboratorialmente em filezinho de peito de frango.

A partir dos resultados obtidos com a aplicação da metodologia de Superfície de resposta, definiu-se o nível ideal de DMDC, que afeta o crescimento de bactérias mesófilas, em filezinhos de peito de frango estocados a 4°C.

Com base nestes resultados foram realizados ensaios para verificação da ação do DMDC sobre a cepa de *Salmonella enteritidis* PT4, inoculada laboratorialmente em filezinho de frango.

Nesta etapa do trabalho empregaram-se filezinhos de peito de frango cedido pelo mesmo abatedouro e transportados em isopor com gelo ao laboratório. O peso médio dos filezinhos foi acertado para 25 gramas $\pm$ 10% antes da contaminação laboratorial.

Foram realizados dois ensaios e os filezinhos foram submetidos aos tratamentos de imersão na solução de dimetildicarbonato (DMDC), imediatamente após a contaminação laboratorial dos filezinhos com *Salmonella enteritidis* CPHL PT-4.

No primeiro ensaio, filezinhos de peito foram submetidos ao tratamento por imersão em solução de DMDC a 4.500 ppm, de duas formas: com agitação e sem agitação da solução. No segundo ensaio, realizaram-se tratamentos de imersão em solução de DMDC à 6.000 ppm com agitação e sem agitação da solução. Em todos os ensaios, um grupo de filezinhos sem tratamento, foi analisado como controle. Uma descrição mais detalhada de cada ensaio é feita a seguir.

As soluções de dimetildicarbonato foram preparadas imediatamente antes de cada ensaio, adicionando-se o volume do produto puro necessário para atingir as concentrações desejadas à água destilada, à temperatura de 17°C e foram preparadas em volumes suficientes para submergir os filezinhos; o DMDC foi dissolvido sob lenta agitação. Uma caixa plástica retangular foi empregada para submeter os filezinhos ao tratamento de imersão.

Quando a agitação da solução de DMDC foi necessária, o recipiente plástico com os filezinhos foi colocado na base de um agitador de peneiras. Para a agitação utilizou-se a pontuação 8,5.

3.2.6.1. Contaminação laboratorial do filezinho de peito de frango com *Salmonella enteritidis* CPHL PT-4 .

A cepa padrão de *Salmonella enteritidis* CPHL-PT4 foi gentilmente cedida pela Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, sendo mantida em ágar gelose.

Para este teste, a cultura foi repicada para caldo simples com incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas, até atingir a densidade de 10^8 a 10^9 UFC/mL. A partir deste foram feitas diluições decimais seriadas, em solução salina contendo 1% de tween 80 até a diluição necessária.

A contaminação dos filezinhos foi realizada em câmara de fluxo laminar. Os filezinhos foram imersos, individualmente, em 50 mL de suspensão contendo 50 células de *Salmonella enteritidis* PT4 ,e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos, para absorção do inóculo.

3.2.6.2. Ensaio realizado

Ensaio I

Este ensaio foi realizado com 60 filezinhos de peito de frango, divididos aleatoriamente em três grupos iguais. Um grupo foi submetido ao tratamento por imersão em solução de DMDC a 4.500 ppm, durante 30 segundos com agitação da solução; o outro grupo foi tratado sob as mesmas condições de concentração e tempo de imersão, porém sem agitação da solução; o terceiro grupo, que não recebeu tratamento algum, foi utilizado como controle. Cinco filezinhos de cada grupo foram analisados para a pesquisa de *Salmonella* após 4 horas, 1,7 e 13 dias de estocagem.

A solução utilizada como sanitizante foi preparada pela adição de 0,45% de DMDC à água destilada a 17°C. Para cada grupo de quatro filezinhos imersos simultaneamente, novas soluções foram preparadas.

Após os tratamentos, os filezinhos foram colocadas para gotejar, embalados em sacos de polietileno de onde foi retirado o excesso de ar e estocados sob refrigeração a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ensaio II

Para este ensaio foram utilizados 60 filezinhos de peito de frango, divididos aleatoriamente em três grupos iguais. Um grupo foi submetido ao tratamento por imersão em solução de DMDC a 6.000 ppm, durante 30 segundos

com agitação da solução; o outro grupo foi tratado sob as mesmas condições de concentração e tempo de imersão, porém sem agitação da solução; o terceiro grupo, que não recebeu tratamento algum, foi utilizado como controle. Cinco filezinhos de cada grupo foram analisados para a pesquisa de *Salmonella* após 4 horas, 1, 7 e 13 dias de estocagem.

A solução utilizada como sanitizante foi preparada pela adição de 0,6% de DMDC à água destilada a 17°C. Para cada grupo de quatro filezinhos imersos simultaneamente, novas soluções foram preparadas.

Após os tratamentos os filezinhos foram colocados para gotejar, embalados em sacos de polietileno de onde foi retirado o excesso de ar e estocados sob refrigeração a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2.6.3. Análise microbiológica

A eficiência do tratamento com DMDC foi monitorada através da pesquisa de *Salmonella*, em cinco filezinhos de peito de frango após a estocagem a 4°C. Desta forma, a influência das variações individuais é minimizada e as conclusões sobre o efeito do tratamento com DMDC na redução microbiana são mais precisas.

De cada lote de filezinhos utilizados, uma porcentagem foi analisada para a pesquisa de *Salmonella* naturalmente presente nas amostras.

Pesquisa de *Salmonella* spp.

Cada filezinho pesando 25 gramas $\pm 10\%$ foi triturado com 225 mL de água peptonada tamponada 1%, durante 20 segundos, em liquidificador. O homogeneizado foi transferido para frasco estéril de boca larga, sendo incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, para pré-enriquecimento.

Em seguida, 1,5 mL foi transferido para 15-18 mL de caldo selenito-cistina e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis contido em tubos; estes foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

A partir de todos os tubos foi realizada a semeadura em superfície de ágar Salmonella-Shigella e de ágar verde brilhante por estrias, com auxílio de alça em cabo de Kölle. As placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24hs.

As colônias suspeitas foram testadas bioquimicamente em meio presuntivo para enterobactérias - IAL (PESSOA & SILVA, 1972; RUGAI & ARAUJO, 1968). A confirmação foi realizada por sorologia, empregando-se soro polivalente somático e flagelar.

3.2.7. Análise sensorial de peito de frango submetido a tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato (DMDC).

Os experimentos foram desenvolvidos com peito de frango com pele e sem osso, cortados longitudinalmente pela metade. Uma metade foi submetida ao tratamento por imersão na solução de DMDC a 4.500 ppm por 30 segundos; a outra

metade foi utilizada como controle sendo imersa apenas na água. O tratamento foi realizado em sala refrigerada com temperatura de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

A solução utilizada como sanitizante foi preparada pela adição de 0,45% (v/v) de DMDC a água destilada a 17°C . Para cada grupo de quatro peitos imersos simultaneamente, novas soluções foram preparadas.

Após os tratamentos os filezinhos foram colocados para gotejar e embalados em sacos de polietileno de onde foi retirado o excesso de ar. Foram resfriados como em um processamento normal de fábrica e armazenados sob refrigeração a $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

As amostras apresentadas aos julgadores, codificadas com 3 dígitos, foram avaliadas quanto à aparência da superfície considerando os parâmetros: cor do músculo, uniformidade e aceitabilidade da cor e cor da gordura da pele. Foram também avaliados a intensidade, o tipo e a aceitabilidade do odor, após a abertura da embalagem.

Utilizou-se uma escala de categoria estruturada, de cinco, sete ou oito pontos; nas avaliações de aceitabilidade utilizou-se um questionário do tipo sim (1) ou não (2) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1995; SILVA & DAMÁSIO, 1996). A ficha empregada para essas avaliações é apresentada no **Anexo A**.

As análises sensoriais foram feitas em cabines individuais com luz branca em local isolado de ruídos e odores, por uma equipe treinada constituída de seis julgadores. Não foram utilizados maior número de julgadores devido à limitação do tempo de observações, durante o qual não ocorram alterações de odor e cor. Os testes utilizados foram baseados nas recomendações da AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION (1991). As questões de aceitação (sim/não)

foram utilizadas para estabelecer a aceitação do produto, considerando-se a média 1,5 para o limite de aceitação.

3.2.7.1. Análise Estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente, empregando-se programas do pacote estatístico STATISTICA - versão 5.0. Utilizou-se análise de variância ou análise multivariada e probabilidade de 5% de significância. As comparações entre as médias foram feitas sempre entre o controle (amostra sem tratamento) e as amostras tratadas ao longo da estocagem, nos dias: 2, 4, 5, 8 e 10.

3.2.8. Determinações físico-químicas em peito de frango submetido a tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato (DMDC)

Os peitos de frango, após as análises sensoriais, foram submetidos a análises físico-químicas: pH e cor pelo sistema CIE $L^*a^*b^*$. Estas determinações foram realizadas a cada dois ou três dias de armazenamento, até que a equipe da análise sensorial as considerasse inadequadas ao consumo.

3.2.8.1. Determinação do pH

O pH foi determinado em 5 pontos escolhidos aleatoriamente na superfície do músculo e pele de cada amostra, em intervalos coincidentes com as demais análises. Utilizou-se potenciômetro portátil Ingold Mod. WTW pH 91, com sistema de indicação digital LCD, precisão $\pm 0,01$ pH, sensor de compensação de temperatura Tec 530 e eletrodo de vidro apropriado para determinações em superfície.

3.2.8.2. Determinação da cor pelo Sistema CIE $L^*.a^*.b^*$.

A determinação da cor objetiva foi realizada com um aparelho portátil, MINOLTA CROMA METER CR 200b, dotado de analisador compacto de tristímulos de cor, área de medida 8 mm, iluminação difusa, ângulo de visão 0° e seis fotocélulas de silicone altamente sensíveis. Sistemas: Y_{xy} (CIE), $L^*.a^*.b^*$, (Y_{xy}), $L^*.a^*.b^*$, E^*_{ab} , iluminantes C e D 65. Neste trabalho utilizou-se o iluminante C, onde quantificou-se a Luminosidade (L^*), o vermelho (a^*) e o amarelo (b^*), no músculo e na pele. A determinação foi realizada em 5 pontos no músculo do lado oposto à pele, em intervalos coincidentes com as demais análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Eficiência da solução de dimetildicarbonato (DMDC) utilizada como sanitizante.

A viabilidade de culturas contendo aproximadamente 10^3 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas spp* e *Escherichia coli* foi testada após tempos de exposição ao dimetildicarbonato previamente estipulados. Testes com novos lotes de DMDC foram realizados antes do início de cada ensaio.

Números de células daqueles microrganismos declinaram ao ponto de total eliminação dos mesmos após tempo de contato com o DMDC, de 4 e 6 h. a 25°C. Não foi observado crescimento microbiano nas placas inoculadas. Isto demonstrou que o agente sanitizante apresentava total atividade bactericida nas concentrações mínimas testadas, o que confirma os dados previamente estabelecidos na **Tabela 1** (níveis de DMDC recomendados como concentração mínima letal) (OUGH, 1983).

4.2. Eficiência da solução de dimetildicarbonato (DMDC) na inativação de *Salmonella enteritidis* CPHL PT4.

A eficiência antimicrobiana do DMDC foi estudada para grupos como bolores, leveduras e bactérias, mas não existem citações relacionadas à ação deste sanitizante especificamente sobre espécies de *Salmonella*.

A eficiência antimicrobiana do dietildicarbonato (DEDC) foi testada em 2 espécies de *Salmonella* : *S. typhimurium* e *S. thompson* (OUGH, 1983). Foi demonstrado que a concentração de 2.000 ppm foi necessária para exercer a atividade bactericida, em uma população inicial de 10^5 células/ mL. Segundo OUGH (1975), o DEDC e o DMDC têm atividades antimicrobianas equivalentes.

A eficiência de uma solução de DMDC a 4.500 ppm foi testada com suspensões de *Salmonella enteritidis* CPHL PT4, contendo diferentes concentrações de células/10 mL.

Os resultados observados na **Tabela 5** indicam a eficiência bactericida do DMDC à concentração testada, que eliminou totalmente as células presentes, independente da população inicial.

TABELA 5. Eficiência da solução de dimetildicarbonato (DMDC) à 4.500 ppm na inativação de *Salmonella enteritidis* PT4*.

Microrganismo	Inóculo Controle Previsto UFC / 10 mL	Inóculo Controle Recuperado UFC / 10 mL	Inóculo Tratado Presença / Ausência
<i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> PT4	100	78	ausência
	50	44	ausência
	25	21	ausência
	10	11	ausência
	5	4	ausência

* Média de 2 repetições

4.3. Vida-de-prateleira de carcaças ou partes de frango submetidas a tratamentos de imersão na solução de dimetildicarbonato (DMDC).

A microbiota da carne de frango é composta por diversos gêneros de microrganismos, incluindo os que foram utilizados nos testes de eficiência da solução de DMDC.

A contagem de bactérias mesófilas aeróbias que desenvolvem-se a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ foi a determinação escolhida para avaliar a eficiência antimicrobiana do DMDC na redução da flora deterioradora e patogênica em carne de frango. O método padrão recomendado para contagem de bactérias mesófilas baseia-se na incubação das placas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, por um período de 24 a 48 h.

Os microrganismos patogênicos geralmente desenvolvem-se bem a temperatura ótima de $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Muitos microrganismos psicrotróficos como *Pseudomonas*, que predominam na superfície de carne de aves, multiplicam-se em temperaturas entre -3°C a 34°C , embora outras espécies não cresçam em temperaturas superiores a 32°C (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS, 1980). Entretanto, os psicrotróficos multiplicam-se bem em temperaturas de refrigeração, que são usualmente empregadas na conservação de carcaças de frango.

Optou-se então pela contagem total de bactérias que cresçam a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, nas condições dos testes, empregando-se o método descrito por INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION (1988).

A caracterização microbiana inicial das amostras foi realizada após 1 dia de armazenamento a 4°C . Esta contagem foi utilizada também para a

comparação com as respectivas amostras tratadas, através da contagem de bactérias mesófilas aeróbias a $30\pm1^{\circ}\text{C}$.

Após os tratamentos com as soluções de DMDC, pesquisou-se a eficiência bactericida de cada tratamento através da contagem de bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas nas carcaças ou partes de frango armazenadas a 4°C .

As primeiras análises microbiológicas de carne de frango tratada, foram realizadas após um dia de armazenamento, após a hidrólise total do DMDC. De acordo com especificações dos fornecedores, a hidrólise ocorre de 4 a 6 h após a adição do produto a água a temperatura de 20°C ; a temperaturas inferiores, tempos de 8 a 12 horas devem ser observados.

As concentrações de DMDC utilizados nos banhos de imersão foram bem acima dos limites máximos permitidos pela legislação (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 1991). Verifica-se que tais concentrações são viáveis, visto que trata-se de uma sanitização superficial das partes, uma vez que o interior dos músculos são estéreis. Calculando-se os níveis de DMDC em relação ao produto total, observam-se concentrações inferiores aos níveis máximos permitidos para DMDC em alimentos, conforme legislação citada acima. Essa elevada dose de sanitizante na superfície da carne, permite uma destruição muito maior das bactérias presentes. (DAUDT & OUGH, 1980).

4.3.1. Vida-de-prateleira de carcaças de frango submetidas ao tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato (DMDC) - Ensaio I

Na **Tabela 6** são apresentados os resultados das contagens totais de bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas nas carcaças de frango submetidas ao tratamento de imersão na solução de DMDC a 25.500 ppm, por 10 segundos, e dos controles correspondentes.

Após um dia de estocagem a contagem de bactérias mesófilas foi reduzida em 1 ciclo logarítmico; após 8 e 15 dias de estocagem, essa redução comportou-se de modo semelhante, comparando-se as contagens obtidas nas carcaças submetidas ao tratamento e nos controles; as reduções foram respectivamente de 1,24 e 0,8 ciclos logarítmicos.

Observa-se que os valores encontrados na enumeração de bactérias mesófilas nas carcaças submetidas ao tratamento foi sempre menor do que os valores encontrados nos controles.

TABELA 6. Bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas em carcaças de frango após tratamento com dimetildicarbonato a 25.500 ppm, durante estocagem a 4°C (log UFC/g)

Tempo de estocagem (dias)	Tratamento	
	Controle ¹	10 seg* ¹
1	2,63	1,65
8	2,30	1,06
15	6,29	5,53

log UFC/g - logaritmo de unidades formadoras de colônia por grama

* Tempo de imersão na solução de DMDC

¹ Utilizou-se apenas uma carcaça por análise

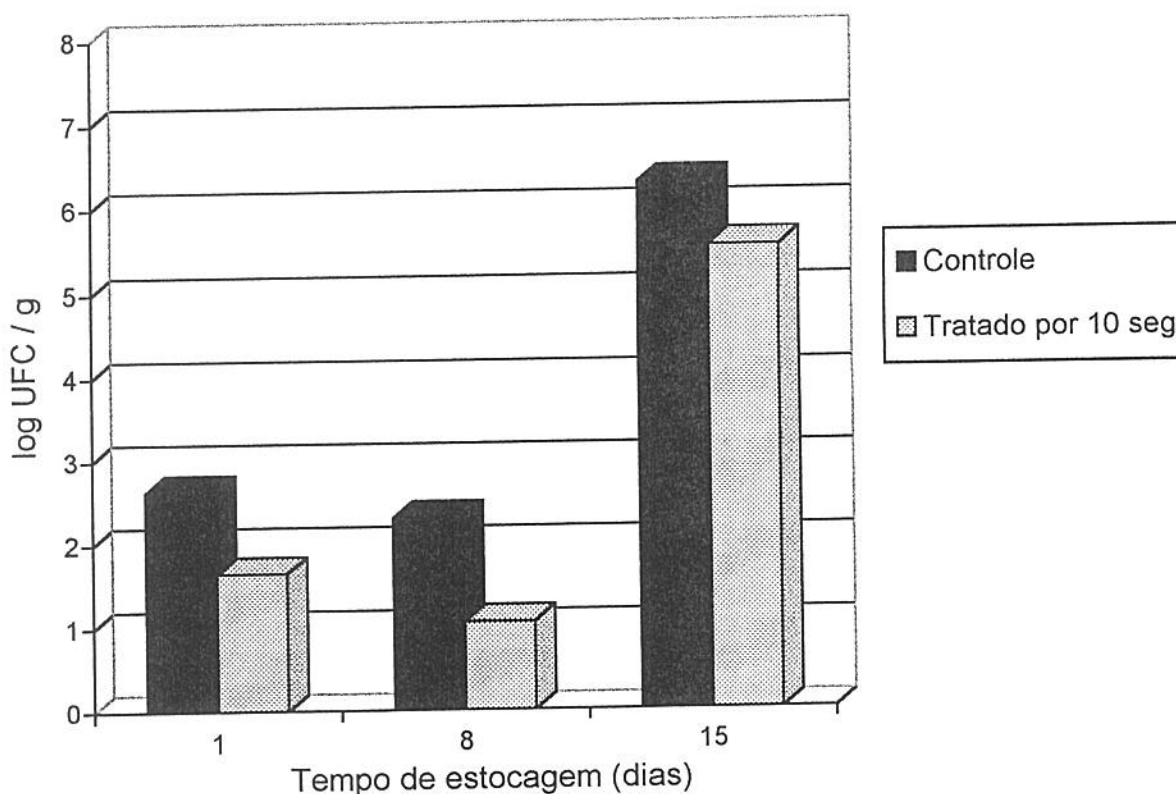


FIGURA 3. Bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas em carcaças de frango após tratamento com dimetildicarbonato a 25.500 ppm. (log UFC/g)

Pela observação da **Figura 3**, podemos visualizar melhor o efeito do tratamento a que foram submetidas as carcaças. As contagens observadas após 8 dias de estocagem foram relativamente menores do que as observadas no 1º dia, tanto nas carcaças tratadas como nas utilizadas como controle. As contagens observadas nas amostras controle apresentaram-se muito reduzidas para o 8º dia de vida-de-prateleira, provavelmente devido à morte de muitos microrganismos

durante a estocagem a frio. Os microrganismos que sobreviveram ao tratamento multiplicaram-se novamente até os níveis observados no 15º dia de estocagem.

Observou-se redução nos níveis de bactérias mesófilas nas carcaças, em todos os dias do teste de vida-de-prateleira.

4.3.2. Vida-de-prateleira de peitos de frango submetidos ao tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato (DMDC) - Ensaio I I

Os valores médios encontrados para contagem total de bactérias mesófilas em peito de frango, submetido ao tratamento por diferentes tempos de imersão na solução de DMDC a 5.000ppm, comparados aos controles, durante o período de estocagem, são apresentados na **Tabela 7**.

Como pode ser observado, os peitos de frango submetidos ao tratamento, apresentaram contagens sempre inferiores às observadas nos controles, em qualquer dia de estocagem.

TABELA 7. Bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas em peito de frango com osso, após tratamento com dimetildicarbonato a 5.000ppm, durante estocagem a 4°C. (log UFC/g)

Tempo de estocagem (dias)	Tratamento			
	Controle ¹	30 seg ^{*,2}	45 seg ^{*,2}	60 seg ^{*,2}
1	3,28	1,50±0,10	1,44±0,18	1,27±0,33
8	6,90	5,48±0,12	4,94±0,14	3,48±0,66
15	9,07	8,15±0,26	7,95±0,18	8,12±0,29

log UFC/g - logarítmo de unidades formadoras de colônia por grama

* Tempo de imersão na solução de DMDC

¹ Utilizou-se apenas um peito de frango por análise

² Média e desvio padrão; utilizaram-se 3 peitos de frango por análise

Após um dia de estocagem as contagens de bactérias mesófilas foram reduzidas em aproximadamente 2,0 ciclos logarítmicos. Maiores reduções foram observadas com aumento do tempo de contato com a solução de DMDC. Já as análises microbiológicas realizadas após oito dias de estocagem mostraram reduções de 1,4, 2,0 e 3,5 ciclos logarítmicos na contagem de bactérias mesófilas, nas amostras submetidas ao tratamento respectivamente, por 30, 45 e 60 segundos de imersão na solução de DMDC, quando comparadas aos controles.

A redução das contagens nos peitos de frango imersos por 60 segundos na solução do produto foi muito significativa, porém não foi possível avaliar-se até que dia de estocagem esta contagem manteve-se reduzida.

No final do ensaio, após 15 dias de estocagem, todas as contagens atingiram níveis de 8,0 log UFC/g. Este aumento no número de microrganismos viáveis, mesmo nas amostras tratadas, pode ser atribuído à multiplicação dos

microrganismos que sobreviveram após a ação antibacteriana inicial do DMDC na redução da flora microbiana. Os microrganismos já não sofrem mais a ação do DMDC que está completamente hidrolizado. Além disso, sem a ação de outros competidores, aqueles microrganismos puderam multiplicar-se novamente durante a estocagem e atingir os níveis citados. Devido à elevada contaminação detectada, os peitos de frango já foram considerados impróprios para o consumo, com as amostras controle apresentando odor típico de deterioração.

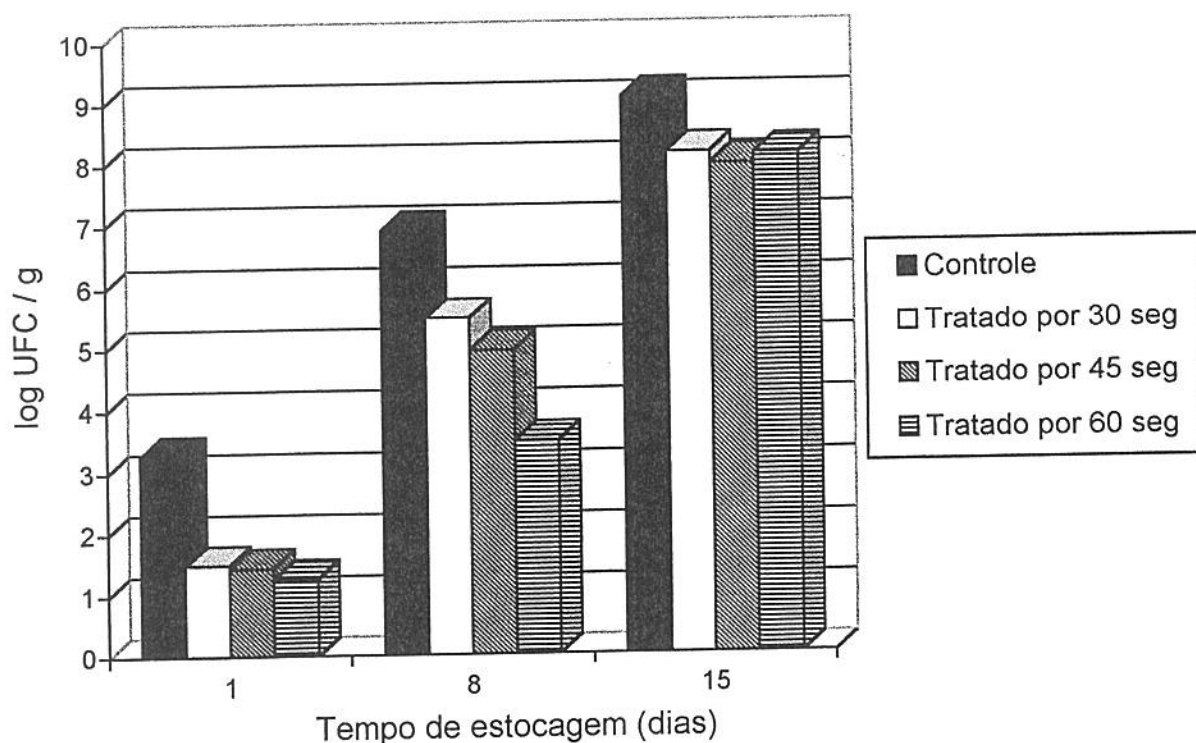


FIGURA 4. Bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas em peito de frango com osso, após tratamento com dimetildicarbonato a 5.000 ppm. (log UFC/g)

A **Figura 4** ilustra melhor a evolução do crescimento de bactérias mesófilas e dos efeitos causados pelos tratamentos por diferentes tempos de imersão

na solução de DMDC, sobre esses microrganismos. O crescimento desses microrganismos foi mais acentuado nos peitos utilizados como controles do que nos que foram submetidos aos tratamentos. Todos os tratamentos mostraram-se eficientes na redução de bactérias mesófilas, porém maior efetividade foi observada nas amostras submetidas ao tratamento de imersão por 60 segundos na solução de DMDC, após 8 dias de estocagem.

Após 1 e 15 dias de estocagem não foi observada diferença significativa nas contagens obtidas nas amostras em função da variação no tempo de imersão nas soluções de DMDC. Em função disso podemos deduzir que o tempo de imersão de 30 seg. pode ser suficiente para a aplicação do DMDC em partes de frango.

4.3.3. Vida-de-prateleira de peitos de frango submetidos ao tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato (DMDC) - Ensaio I I I

Pelos resultados obtidos durante a determinação da vida-de-prateleira de carcaça e de peito de frango submetido ao tratamento de imersão nas soluções de DMDC, verificou-se que os dois tratamentos aplicados reduziram a contagem de bactérias mesófilas na superfície da carne de aves. Uma efetiva redução da flora de organismos mesófilos foi observada após a exposição de peito de frango à concentração de 5.000ppm de DMDC por 60 segundos.

O DMDC não esterilizou ou eliminou completamente a flora microbiana na superfície da carne, porém não foi possível calcular a extensão da vida-de-prateleira. Como observado com outros agentes sanitizantes, a presença de matéria orgânica é prejudicial à atividade antimicrobiana de muitos sanitizantes (SMULDERS, 1986; BANWART, 1979). No caso deste sanitizante, a presença de

material protéico também pode ter afetado a eficiência antimicrobiana (OUGH, 1983).

Novos ensaios foram realizados visando identificar a relação concentração - tempo de exposição ao produto e a atividade antimicrobiana observada em carne de frango.

No terceiro ensaio, repetiu-se o tratamento, imergindo-se os peitos de frango em soluções de DMDC ao nível de 2.000ppm, com variações nos tempos de imersão, uma vez que não existem dados sobre as concentrações para aplicação do produto em carnes de aves.

Os valores médios encontrados na contagem total de bactérias mesófilas em peito de frango, submetido ao tratamento por diferentes tempos de imersão na solução do produto, comparados aos controles, durante o armazenamento são apresentados na **Tabela 8**.

Neste ensaio, após 1 dia de estocagem foram observadas reduções de 1,3 e 1,5 ciclos logarítmicos para as amostras submetidas a tratamentos de imersão em soluções de DMDC, respectivamente, por 30 e 60 segundos, quando comparadas com o controle; nas amostras submetidas ao tratamento de imersão por 15 segundos, não foi observada redução da contagem. Após 8 dias de estocagem, todos os peitos de frango submetidos ao tratamento apresentaram contagens inferiores às observadas no controle com reduções da ordem de 2,0 ciclos logarítmicos.

TABELA 8. Bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas em peito de frango com osso após tratamento com dimetildicarbonato a 2.000 ppm, durante a estocagem a 4°C (log UFC/g)

Tempo de estocagem (dias)	Tratamento			
	Controle ¹	15 seg ^{*,1}	30 seg ^{*,1}	60 seg ^{*,1}
1	2,88±1,0	3,06±0,75	1,60±0,45	1,36±0,50
8	8,52±0,32	6,38±0,23	6,77±0,83	6,15±0,64
15	8,84±0,58	8,63±0,20	8,62±0,52	9,21±0,73

log UFC/g - logaritmo de unidades formadoras de colônia por grama

* Tempo de imersão na solução de DMDC

¹ Média e desvio padrão; utilizaram-se 3 peitos de frango por análise

No final do ensaio, após 15 dias de estocagem, não foram detectadas diferenças nas contagens de bactérias mesófilas, entre os peitos tratados e os controles. Todos as contagens ultrapassaram 8,0 log UFC/g , determinando o final da vida-de-prateleira. Muitos microrganismos foram destruídos nas primeiras horas após a ação do DMDC. Aqueles microrganismos que sobreviveram ao tratamento, já não sofrem mais a ação do DMDC que está completamente hidrolizado; além disso, sem ação de outros competidores, puderam multiplicar-se atingindo níveis elevados após 15 dias de armazenamento.

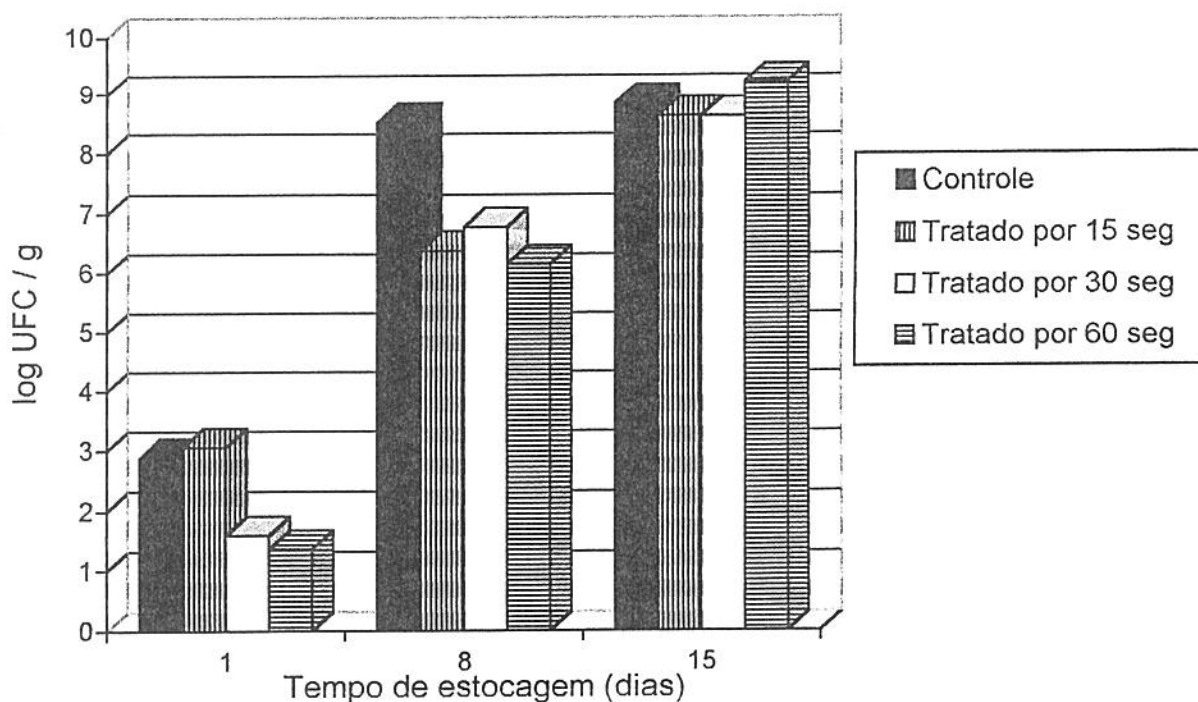


FIGURA 5. Bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas em peito de frango com osso após tratamento com dimetildicarbonato a 2.000 ppm. (log UFC/g)

Observando a **Figura 5**, percebe-se que os resultados encontrados para a contagem de organismos mesófilos, confirmam o ensaio anterior. A redução de aproximadamente 2,0 ciclos logarítmicos observada após 8 dias de estocagem a 4°C em peito com osso, submetido a tratamento de imersão por 15, 30 ou 60 segundos na solução do sanitizante é muito significativa; porém não foi possível determinar-se até que dia de estocagem estas contagens mantiveram-se reduzidas. Por estes resultados pode-se verificar que não é necessário submeter as amostras a tratamento de imersão por 60 seg., pois bons resultados foram obtidos em tempos de imersão de 15 ou 30 seg.

Concluimos, portanto, que o tempo de imersão de 30 seg. é suficiente para aplicação do DMDC em partes de frango. Uma vez que dispõe-se de pouco

espaço e tempo na nória, quanto menor o tempo para um tratamento subsequente ao resfriamento, maiores facilidades serão encontradas na sua aplicação na linha de abate.

Além disso, quanto menor o volume de DMDC a ser aplicado, torna-se mais fácil a manutenção de sua estabilidade em um tanque para imersão das partes de frango.

Pode-se observar que o tratamento com 2.000 ppm de DMDC mostrou-se relativamente menos eficiente na redução da flora microbiana, em função da menor concentração do produto empregada na solução de imersão.

Estes dados estão de acordo com a literatura. DAUDT & OUGH (1980), em estudos empregando o DMDC, descreveram que a taxa de morte ou esterilização microbiana é proporcional à concentração utilizada.

4.3.4. Vida-de-prateleira de filezinhos de peito de frango submetidos ao tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato (DMDC) - Ensaio IV

Os valores médios encontrados na contagem total de bactérias mesófilas em filezinhos de peito de frango, submetidos ao tratamento de imersão na solução de DMDC a 5.000ppm por diferentes tempos, comparados aos controles, são apresentados na **Tabela 9**.

TABELA 9. Bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas em filé de peito de frango após tratamento com dimetildicarbonato a 5.000 ppm, durante estocagem a 4°C (log UFC/g)

Tempo de estocagem (dias)	Tratamento		
	Controle ¹	30 seg ^{*,1}	60 seg ^{*,1}
1	4,05±0,18	3,65±0,43	3,35±0,11
8	5,19±0,90	4,50±0,60	5,05±0,70
15	8,15±0,32	7,92±0,40	7,83±0,40

log UFC/g - logaritmo de unidades formadoras de colônia por grama

* Tempo de imersão na solução de DMDC (provavelmente muito hidrolizado)

¹ Média e desvio padrão; utilizaram-se 4 filezinhos por análise

Como pode ser observado, os filezinhos submetidos ao tratamento apresentaram contagens sempre inferiores às observadas nos controles, em qualquer dia de estocagem, porém a ação do DMDC não foi eficiente na redução da flora microbiana, como observado nas amostras analisadas nos ensaios anteriores

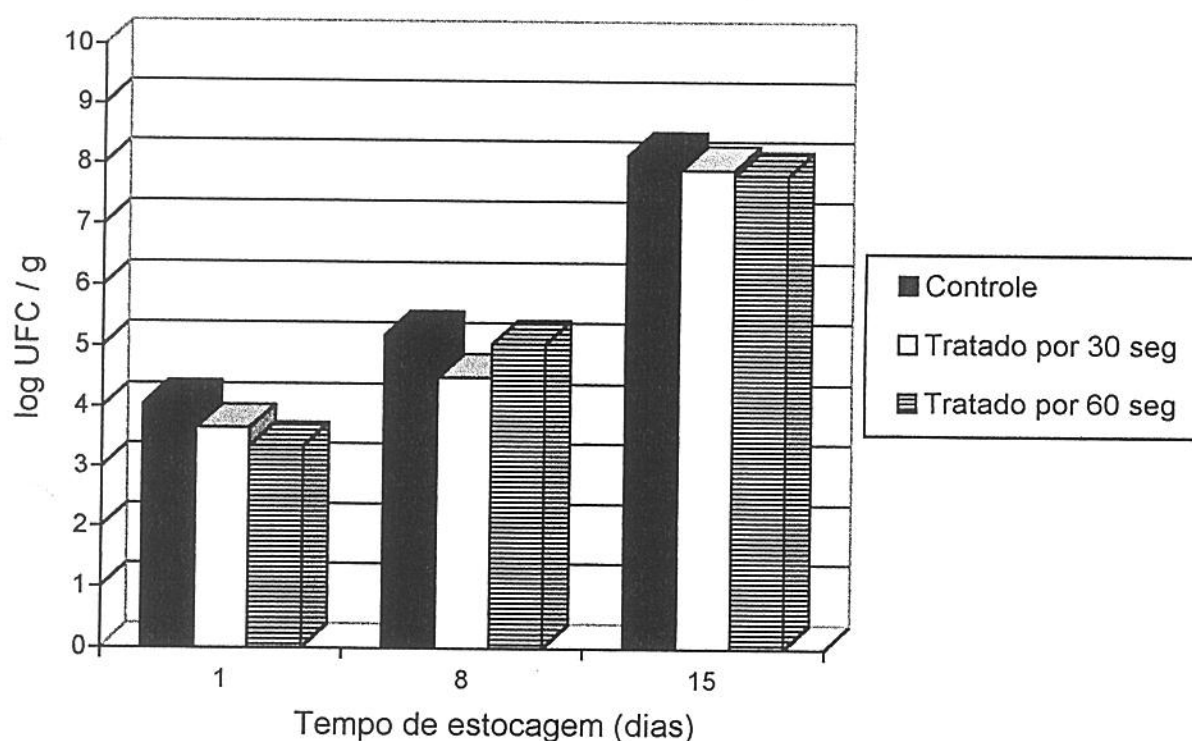


FIGURA 6. Bactérias mesófilas aeróbias ou anaeróbias facultativas em filezinho de peito de frango após tratamento com dimetildicarbonato a 5.000 ppm. (log UFC/g)

A **Figura 6** ilustra melhor a evolução do crescimento das bactérias mesófilas e dos efeitos causados pelo tratamento. É importante observar-se que, no primeiro dia de análise, os filezinhos de peito de frango controle apresentavam uma carga de bactérias mesófilas maior do que a detectada nas amostras de carcaça ou peito de frango utilizadas nos ensaios anteriores. Isto é explicado em função de que o processo de obtenção do filé envolve manuseio maior da carne, aumentando assim a carga microbiana inicial, que por sua vez pode ter interferido também na eficiência do tratamento sanitizante.

PAULI & GENTH (citado por OUGH, 1983), em estudos realizados com dietildicarbonato (DEDC), demonstraram que, para um aumento de 10 vezes no

número de células, a quantidade de DEDC deve ser duplicada para exercer a mesma ação.

Por outro lado, após uma avaliação de todos os resultados pudemos observar que o DMDC não mostrou-se tão eficaz neste ensaio.

O DMDC pode sofrer uma degradação prematura, após a abertura do frasco original. Se o produto ficar em contato com o oxigênio, pode tornar-se ineficiente como bactericida. Este fato provavelmente explica a baixa eficiência observada nas amostras tratadas neste teste. Portanto, um correto armazenamento do DMDC foi necessário para a manutenção de sua eficácia como sanitizante, durante o estudo. Até este tratamento o produto foi mantido no frasco original e a temperatura ambiente. A manutenção adequada do DMDC foi feita dividindo-se o produto em volumes menores e armazenando-os sob refrigeração, visando manter a estabilidade do mesmo para os próximos experimentos.

Os dados observados nos ensaios anteriores parecem demonstrar uma relação entre a eficiência antimicrobiana e a concentração de DMDC utilizada nos tratamentos de imersão. OUGH (1983) e DAUDT & OUGH (1980) relataram que a concentração de DMDC utilizada foi o principal fator determinante da taxa de morte microbiana.

Este efeito também foi descrito para outros agentes sanitizantes, como por exemplo o ácido láctico; sua eficiência é comprovadamente maior quando o produto é usado em concentrações mais altas, sendo que o limite de concentração é aquele em que começam a ocorrer mudanças nas propriedades sensoriais do alimento (SMULDERS et alii, 1986).

Na aplicação do DMDC por imersão deve-se controlar a concentração adequada da solução durante o processo, uma vez que a reatividade do DMDC, relatada por OUGH (1983), é tal que a reação do produto com materiais proteicos em suspensão pode ser a responsável pela redução da eficiência do tratamento.

Estudos mais completos sobre a interação do DMDC com outros componentes alimentares são necessários, a fim de determinar sua atividade inibitória.

4.4. Otimização do tempo de imersão e concentração de dimetildicarbonato (DMDC) no tratamento de filezinhos de peito de frango.

Concluídas as análises da primeira fase do trabalho, foi possível verificar a eficiência do DMDC na redução da carga de bactérias mesófilas na superfície da carne de frango. Além disso, após 15 dias de estocagem, as amostras submetidas aos tratamentos com diferentes concentrações de DMDC apresentavam-se aceitáveis quanto ao odor e aparência geral, enquanto os controles estavam severamente deteriorados, apesar das contagens microbianas serem inaceitáveis em todas as amostras. Face a estes resultados, decidiu-se aprofundar os estudos utilizando-se o dimetildicarbonato.

Da forma como os experimentos foram montados, realizando-se análises microbiológicas após 1, 8 e 15 dias de estocagem, não foi possível avaliar exatamente em que dia de estocagem as amostras atingiram contagens que tornaram a carne imprópria para o consumo.

Além disso, como já citado anteriormente não existem na literatura dados disponíveis sobre os níveis de concentração para aplicação do DMDC em carne de aves. Portanto, tomou-se como ponto de partida, neste experimento, as concentrações do produto utilizadas nos ensaios preliminares, visto que reduções significativas nas contagens de bactérias mesófilas foram observadas.

Verificamos a necessidade de um delineamento estatístico que avaliasse as reais diferenças nas contagens microbianas entre as amostras tratadas e os controles, para assim podermos chegar à otimização da concentração de DMDC e tempo de imersão na solução do produto, visando atingir a estabilidade microbiológica da carne de frango e avaliar o efeito na vida de prateleira.

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida por G.E.P. Box na década de 50, e, desde então, tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais. Com o emprego de um planejamento experimental baseado em princípios estatísticos é possível extrair o máximo de informações úteis a respeito da aplicação de um sanitizante, fazendo um menor número de experimentos, o que acarreta redução de custos laboratoriais e aumento de eficiência e produtividade no processo (BARROS NETO et alii, 1995).

Este tipo de delineamento experimental, até o momento, não foi usado para estudar a aplicação de agentes sanitizantes em carnes.

Os três fatores a serem controlados nesse experimento foram definidos: concentração de DMDC, tempo de imersão do filé na solução sanitizante e tempo de estocagem de filezinho de peito de frango. A variável resposta de interesse neste caso foi a contagem de bactérias mesófilas aeróbias (em UFC/g) observada nos filezinhos.

Desta forma, consideremos:

N_1 = contagem de bactérias mesófilas aeróbias antes do tratamento (UFC/g) - inicial

N_2 = contagem de bactérias mesófilas aeróbias depois do tratamento (UFC/g) - final

$Y_i = N_2 - N_1$ = diferença entre contagem de bactérias mesófilas aeróbias (UFC/g) final e inicial,
ou seja, crescimento de bactérias em UFC/g , durante o experimento.

X_1 = Concentração de DMDC.

X_2 = Tempo de imersão do filé na solução de DMDC.

X_3 = Tempo de estocagem de filezinho de peito de frango.

Foi ajustado um modelo polinomial de 2ª ordem da seguinte forma:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1^2 + b_5X_2^2 + b_6X_3^2 + b_7X_1X_2 + b_8X_1X_3 + b_9X_2X_3 + \epsilon_i \quad (1)$$

onde:

X_1 , X_2 e X_3 foram definidos acima

$b_0, b_1, \dots, b_9$ são parâmetros a serem estimados pelo modelo.

ϵ_i = resíduo, diferença entre o valor calculado e experimental.

$$Y_i = \hat{Y} + \epsilon_i$$

Os parâmetros deste modelo foram estimados através do método de mínimos quadrados e sua significância no modelo foi verificada a partir de correspondentes testes F de uma tabela de Análise de Variância. Para validade deste modelo de regressão, temos que os resíduos do modelo ajustado tenham distribuição normal com média 0 e variância constante (suposição de homocedasticidade dos resíduos).

Portanto, em resumo, podemos dizer que, através do uso desta metodologia, procuraremos ajustar o modelo definido em (1) de forma que seja possível estabelecer para que combinações de concentração de dimetildicarbonato, tempo de imersão do filé na solução e tempo de estocagem a 4°C, a contagem de bactérias mesófilas aeróbias esteja em níveis aceitáveis para o consumo de filezinho de peito de frango.

Para possibilitar o ajuste do modelo (1), foi necessário adequado planejamento experimental. Os pontos experimentais foram definidos segundo um Planejamento Composto Central (PCC) indicado para o caso de agentes polinomiais de 2ª ordem (BARROS NETO et alii, 1995). Este planejamento está detalhado na **Tabela 4**.

Conforme este planejamento, foram obtidos os valores das contagens de bactérias mesófilas aeróbias (UFC/g) em filezinhos de peito de frango antes e depois dos tratamentos. Todos os dados coletados nos pontos experimentais encontram-se no **Anexo B**.

4.4.1. Transformação dos Dados Originais.

Inicialmente, ajustado o modelo (1) para os valores da diferença entre as contagens de bactérias (em UFC/g) final e inicial, observou-se que o modelo tinha resíduos que não seguem uma distribuição normal, indicando falta de ajuste. Desta forma, optou-se por utilizar uma transformação nos dados observados. A transformação utilizada foi a de BOX-COX (BOX et alii, 1978) que apresenta a seguinte forma:

$$y^\lambda = \frac{y^\lambda - 1}{\lambda(\bar{y})^{\lambda-1}} \quad y^0 = \bar{y} \ln y \quad (2)$$

onde $\bar{y}$ é a média geométrica dos valores originais de Y.

O problema neste caso consiste em determinar o valor de λ que resulte numa adequada transformação dos valores observados. Neste caso devemos escolher aquele valor para o qual λ proporcione a menor soma de quadrados de resíduos para o modelo a ser ajustado (BOX et alii, 1978). Realizados os procedimentos para escolha de λ , encontramos que o valor a ser utilizado deveria ser

$$\lambda = 0,31.$$

Portanto a análise será feita com base numa transformação dos dados originais dada por (2) com valor de $\lambda = 0,31$.

4.4.2. O Ajuste do Modelo Completo (1).

Após definida a transformação nos dados ajustou-se o modelo (1) para os dados transformados, através do procedimento RSREG do software SAS. Os resultados obtidos neste ajuste são apresentados nas tabelas a seguir:

TABELA 10. Análise de variância para componentes do modelo

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados*	R ²	F	Prob > F
Linear	3	243.94	0.70	71.03	0.0000
Quadrática	3	19.564	0.05	5.69	0.0016
Termos Cruzados	3	8.7131	0.02	2.53	0.0644**
Total	9	272.22	0.78	26.24	0.0000

* multiplicado por 10¹⁴** significativo ($\alpha=5\%$)

Portanto através desta tabela verificamos que os componentes lineares e quadráticos não devem ser retirados do modelo o que não ocorre com os termos cruzados. O modelo total é significativo com um $R^2 = 0,78$.

TABELA 11. Teste para Falta de Ajuste

Resíduos	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados*	Quadrado Médio*	F	Prob > F
Falta de Ajuste	5	9.0667	1.8133	1.667	0.1567
Erro Puro	59	64.192	1.0880		
Erro Total	64	73.259	1.1446		

*multiplicado por 10¹⁴

O valor de F, quociente de MQ_{faj}/MQ_{cp} igual à 1,67 é menor do que o valor tabelado de F e com 5 e 59 graus de liberdade ao nível de 95% de confiança é

de 2,37. Por isto, não existe evidência de falta de ajuste do modelo com os valores transformados. Esta conclusão é consistente com o valor da probabilidade de 0,157 na Tabela 11.

TABELA 12. Estimativa e teste de hipóteses para os parâmetros estimados

Parâmetro	Graus de Liberdade	Estimativa dos Parâmetros*	Erro Padrão**	T	Prob > T
Intercepto	1	1.3703242	2.840763	4.824	0.0000***
X ₁	1	-5.3811351	1.263908	-4.258	0.0001***
X ₂	1	0.1636781	1.261871	1.297	0.1993
X ₃	1	181.1447216	1.504846	12.059	0.0000***
X ₁ X ₁	1	0.4334884	1.158104	3.743	0.0004***
X ₁ X ₂	1	3.0111316	1.771334	1.700	0.0940
X ₂ X ₂	1	0.1871114	1.157973	1.616	0.1110
X ₁ X ₃	1	-0.3908115	1.774718	-20202	0.0313***
X ₂ X ₃	1	0.0262553	1.771334	0.148	0.8826
X ₃ X ₃	1	0.4130118	1.376761	3.000	0.0038***

* multiplicado por 10⁷

** multiplicado por 10⁶

*** significativo ($\alpha=5\%$)

Portanto, a partir dos resultados acima, observou-se que a presença da grande maioria dos parâmetros é significativa para o modelo. Nos parâmetros não significativos temos que todos têm a presença da variável 2 (*tempo de imersão na solução*), o que nos leva à hipótese de que este fator pode ser desconsiderado no ajuste. Para se verificar esta hipótese apresentamos a tabela a seguir.

TABELA 13. Teste para necessidade da presença das variáveis no modelo.

Variável	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados*	Quadrado Médio*	F	Prob > F
X ₁	4	49.671	12.419	10.848	0.0000**
X ₂	4	7.7944	1.9486	1.702	0.1604
X ₃	4	242.98	60.745	53.068	0.0000**

* multiplicado por 10¹⁴

** significativo ($\alpha=5\%$)

Portanto, os testes da tabela acima confirmam nossa hipótese anterior, ou seja, os fatores 1 e 3 são significativos no ajuste do modelo enquanto o fator 2 (*tempo de imersão*) não se faz necessário.

Desta forma concluímos que *o tempo de imersão dos filés* (no intervalo de 15 a 75 segundos) não contribui significativamente para o ajuste do modelo (1).

4.4.3. Ajuste do Modelo Reduzido.

A partir da exclusão do fator 2, temos então que o modelo polinomial de 2ª ordem passa, neste caso, a ser reescrito como:

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_3 + b_3X_1^2 + b_4X_3^2 + b_5X_1X_3 + \epsilon_i \quad (3)$$

O procedimento realizado em 4.4.2. foi agora repetido para o ajuste do modelo acima, obtendo-se os seguintes resultados.

TABELA 14. Análise de variância para componentes do modelo.

Fonte de variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados*	R^2	F	Prob > F
Linear	2	242.36	0.7012	101.7	0.0000**
Quadrática	2	16.926	0.0490	7.10	0.0016**
Termos Cruzados	1	5.1341	0.00149	4.308	0.0416**
Total	5	264.42	0.7654	44.368	0.0000**

* multiplicado por 10^{14}

** significativo ($\alpha=5\%$)

Portanto, verificamos agora que todos os componentes, linear, quadrático e termos cruzados, são significativos e não devem ser retirados do modelo. O modelo total é significativo com um $R^2 = 0,77$.

TABELA 15. Teste para falta de ajuste.

Resíduos	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados*	Quadrado Médio**	F	Prob > F
Falta de Ajuste	8	1.6829	2.1036	1.965	0.0666
Erro Puro	60	6.4224	1.0704		
Erro Total	68	8.1053	1.1919		

* multiplicado por 10^{15}

** multiplicado por 10^{14}

A tabela acima nos leva a não rejeição da falta de ajuste do modelo, ou seja, não existe uma falta de ajuste significativa, portanto o modelo estimado está apto para ser analisado sem a necessidade de incorporar outras componentes e/ou formas.

TABELA 16. Estimativa e teste de hipóteses para os parâmetros estimados

Parâmetro	Graus de Liberdade	Estimativa dos Parâmetros*	Erro Padrão**	T	Prob > T
Intercepto	1	1.6739500	2.083396	8.035	0.0000***
X ₁	1	-0.5459484	1.288637	-4.237	0.0001***
X ₃	1	1.8229664	1.533445	11.888	0.0000***
X ₁ X ₁	1	0.3609133	1.080854	3.339	0.0014***
X ₁ X ₃	1	-0.3752999	1.808209	-2.076	0.0417***
X ₃ X ₃	1	0.3400053	1.327578	2.561	0.0127***

* multiplicado por 10⁷

** multiplicado por 10⁶

*** significativo ($\alpha=5\%$)

Dessa forma, temos agora que todos os parâmetros são estatisticamente significativos para o ajuste do modelo, ou seja, todos eles devem estar presentes, como também é reiterado pelos valores da tabela abaixo.

TABELA 17. Teste para necessidade da presença das variáveis no modelo.

Variável	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados*	Quadrado Médio*	F	Prob > F
X ₁	3	4.3713	1.4571	12.224	0.0000**
X ₃	3	24.392	8.1308	68.214	0.0000**

* multiplicado por 10¹⁵

** significativo ($\alpha=5\%$)

Pelos valores acima, ratificamos a hipótese de que nenhum dos dois fatores podem ser agora retirados do modelo ajustado.

Em função do resultados acima, temos então que o modelo final (3) ajustado é dado por:

$$Y_1 = 16,74^* - 5,46^* X_1 + 18,23^* X_3 + 3,61^* X_1^2 + 3,40^* X_3^2 - 3,75^* X_1 X_3.$$

A superfície gerada por esta função polinomial, bem como suas respectivas curvas de níveis são apresentadas nas **Figuras 7 e 8**, respectivamente.

A **Figura 7** mostra a variação da taxa de crescimento bacteriano, avaliada através das contagens de bactérias mesófilas (em UFC/g) em relação ao aumento da concentração de dimetildicarbonato e o tempo de estocagem dos filezinhos de peito de frango a 4°C.

A **Figura 8** apresenta as curvas de níveis correspondentes à superfície mostrada na **Figura 7**.

Para melhor compreensão dos fatos, foi elaborada a **Tabela 18** que contém os valores previstos pelo modelo reduzido para o crescimento das bactérias aeróbias mesófilas (em log UFC/g), para cada dia de estocagem dos filezinhos a 4°C, tratados com diferentes concentrações de dimeltildicarbonato (DMDC).

Assim, pode-se verificar o efeito do tratamento com diferentes concentrações de DMDC na taxa de crescimento das bactérias mesófilas, durante o tempo de estocagem de filezinhos a 4°C, para pontos não utilizados experimentalmente, mas que pertencem à região experimental pré-definida, como mostrado na **Tabela 4**.

As amostras empregadas neste estudo, apresentaram contagem inicial de bactérias aeróbias mesófilas de 3,20 log UFC/g (média obtida dos dados do **Anexo B**).

Pelos resultados apresentados nas **Figuras 7 e 8** e na **Tabela 18**, verificamos que a multiplicação bacteriana deu-se desde o início da estocagem, com taxas de crescimento influenciadas pelos níveis de DMDC utilizados. Taxas de crescimento significativamente maiores foram observadas, quando menores concentrações de DMDC foram empregadas nas soluções de imersão dos filezinhos.

Com concentrações de DMDC mais elevadas, as taxas de crescimento bacteriano foram progressivamente reduzidas, de forma que se pode observar que maiores níveis do agente sanitizante foram mais eficientes no controle do crescimento das bactérias mesófilas. Tais resultados mostram a relação entre a eficiência antimicrobiana e a concentração de DMDC empregada nos tratamentos de imersão e confirmam os dados descritos na literatura (OUGH, 1983; DAUDT & OUGH, 1980).

Aumentos progressivos nas taxas de crescimento microbiano foram observados a partir do 5º dia de estocagem dos filezinhos a 4°C, independentemente da concentração do sanitizante empregada.

Os resultados também mostraram que a população de mesófilos foi progressivamente reduzida com o aumento da concentração de DMDC conforme citado, porém o crescimento bacteriano voltou a aumentar, com o emprego de concentrações de DMDC mais elevadas de até níveis de 6.000 ppm na solução de imersão dos filezinhos.

Quando utilizou-se a concentração de 6.000 ppm de DMDC, provavelmente a destruição de bactérias nestas amostras foi maior do que naquelas tratadas a 4.500 ppm; isto permitiu que os microrganismos sobreviventes pudessem multiplicar-se mais rapidamente devido à eliminação dos competidores.

Pela **Tabela 18** pode-se avaliar quais as concentrações de DMDC onde as taxas de crescimento bacteriana serão menores, em função do tempo de estocagem dos filezinhos. Nestes dados interessou-nos observar as taxas de crescimento bacteriano para tempos de estocagem acima de 8 dias, visando verificar a influência dos tratamentos aplicados na vida de prateleira de filezinho de peito de frango.

Assim, observou-se que no período entre 8 e 9 dias de estocagem as amostras tratadas com níveis de 3.900 a 4.200 ppm de DMDC apresentaram as menores taxas de crescimento de mesófilos, que foram de 3,3 e 3,6 ciclos logarítmicos, respectivamente.

No período de 10 dias de estocagem, as amostras tratadas com níveis de 4.200 a 4.500 ppm de DMDC apresentaram a menor taxa de crescimento, que foi de 3,9 ciclos logarítmicos.

No período de 11 e 12 dias de estocagem, as amostras tratadas com níveis de 4.500 a 4.800 ppm de DMDC apresentaram as menores taxas de crescimento, que foram de 4,2 e 4,5 ciclos logarítmicos, respectivamente.

Para a estocagem dos filezinhos por períodos acima de 13 dias é necessário empregar-se níveis de DMDC acima de 4.800ppm; as menores taxas de crescimento bacteriano observadas nestes casos foram de 4,7, 4,9, 5,0, 5,2 e 5,4 ciclos logarítmicos, respectivamente para 13, 14, 15, 16 e 17 dias de estocagem.

Sabendo que as amostras utilizadas neste experimento apresentaram contagem inicial de bactérias aeróbias mesófilas de 3,2 log UFC/g, as contagens finais de bactérias aeróbias mesófilas nos filezinhos de peito de frango, controle ou tratados, podem ser obtidas empregando-se os dados da **Tabela 18**.

No período de estocagem de 8 e 9 dias, as amostras tratadas com concentrações de DMDC de 3.900 a 4.200 ppm, apresentaram contagens finais de bactérias mesófilas de 6,5 e 6,8 log UFC/g, respectivamente, o que representa reduções de 1,5 e 1,4 ciclos logarítmicos em relação às contagens observadas nas amostras controle (0 ppm de DMDC) para os mesmos dias de estocagem.

No 10º dia de estocagem dos filezinhos tratados com níveis de 4.200 a 4.500 ppm de DMDC, a população de bactérias mesófilas atingiu 7,2 log UFC/g, apresentando contagem 1,2 ciclos logarítmicos menor do que a contagem das amostras sem tratamento (0 ppm de DMDC) para o mesmo dia de estocagem.

No período de 11 e 12 dias de estocagem, as amostras tratadas com níveis de DMDC de 4.500 a 4.800 ppm, atingiram contagens finais de bactérias mesófilas de 7,4 e 7,7 log UFC/g, respectivamente, o que representa reduções de 1,2 e 1,1 ciclos logarítmicos comparado com as amostras controle (0ppm de DMDC) para os mesmos dias de estocagem.

No 13º dia de estocagem, as amostras tratadas com níveis de DMDC de 4.800 a 5.100 ppm apresentaram contagens de bactérias mesófilas de 8,0 log UFC/g. A carne tornou-se inaceitável para o consumo, visto que o limite máximo de contagem de bactérias mesófilas foi atingido, determinando o final da vida de prateleira.

As amostras tratadas com 4.500 ppm de DMDC tiveram sua vida de prateleira prolongada até o 11º - 12º dia de estocagem, pois apresentaram contagens da ordem de 7,4 - 7,7 log UFC/g, enquanto as amostras controle já tinham atingido contagens de 8,0 log UFC/g no 8º dia de estocagem.

Concluiu-se que a concentração de DMDC ao redor de 4.500 ppm pode ser considerado o nível ótimo para aplicação do produto no tratamento de filezinhos de peito de frango, visando a redução da contagem de bactérias mesófilas inicialmente presentes na carne.

Durante a análise estatística dos dados, foi elaborado um teste para verificar a necessidade da presença das três variáveis no modelo elaborado: concentração de DMDC, tempo de imersão na solução e tempo de estocagem dos filezinhos. Este teste revelou que o *tempo de imersão* dos filés na solução de DMDC, no intervalo de 15 a 75 segundos, não contribui significativamente para o modelo, o que quer dizer que esta variável não afeta a taxa de crescimento microbiano.

Portanto, pode-se concluir que a concentração de DMDC é o principal parâmetro, dentre os estudados, que interferiu na vida de prateleira dos filezinhos de peito de frango. Estes resultados estão de acordo com os descritos por DAUDT & OUGH (1980), que relataram que a concentração de DMDC empregada foi o principal fator determinante da taxa de morte microbiana.

Nesse estudo pode-se observar a eficiência do DMDC como agente sanitizante de filezinhos de peito de frango estocados a 4°C, e em função disso algumas considerações devem ser feitas a respeito da relação existente entre a resistência microbiana ao DMDC e outros fatores que podem interferir na sua eficiência.

Segundo TURTURA (citado por OUGH, 1983), a eficiência do dietildicarbonato (DEDC) aumentou com a elevação da temperatura, sendo duas vezes maior à temperatura de 27°C do que a 0°C.

SPLITTSTOESSER & WILKISON (1973) também observaram que a manutenção de elevadas temperaturas durante a incubação de culturas de alguns microrganismos com dietildicarbonato (DEDC) resultou em diminuição significativa da porcentagem de sobreviventes, e que as reações letais sobre as culturas foram inibidas a baixas temperaturas. Por outro lado a taxa de hidrólise do DEDC aumentou com a elevação da temperatura.

TERRELL et alii (1993) e RIET et alii (1989) também relataram dados similares em relação ao aumento da temperatura e à eficiência antimicrobiana do dimetildicarbonato (DMDC).

Os fornecedores de DMDC recomendam que o produto seja aplicado a temperaturas de 10 a 12°C, provavelmente devido à redução da taxa de hidrólise, favorecendo uma esterilização mais eficiente.

No nosso estudo, o dimetildicarbonato a 17°C foi aplicado à carne de frango, pois abaixo desta verificou-se a cristalização do produto na solução. Para contornar o problema da rápida taxa de hidrólise do produto, novos banhos foram preparados para a imersão das amostras em cada teste. A temperatura a que a carne foi submetida imediatamente depois da aplicação do produto foi de aproximadamente 0°C, pois as amostras foram resfriadas em uma câmara de

resfriamento, como é feito em um processamento normal, o que pode ter influenciado negativamente a eficiência dos tratamentos.

Outro fator interferente refere-se à ação antimicrobiana em função do grupo microbiano. Estudos envolvendo variações na contagem de células viáveis após tempos de exposição ao dietildicarbonato (DEDC) revelam diferentes respostas, dependendo do microrganismo (SPLITTSTOESSER & WILKISON, 1973). OKAFOR (1975) também descreveu essa variação e relatou que o DEDC foi mais efetivo na redução do número de células de leveduras em comparação com a redução no número de bactérias. Realmente o DEDC foi inicialmente estudado como eficiente na redução de bolores e leveduras em vinhos, cerveja e sucos de frutas.

De acordo com os estudos realizados com DEDC e DMDC, as maiores taxas de destruição dos bolores e leveduras ocorrem durante as primeiras horas de contato com o produto (SPLITTSTOESSER & WILKISON, 1973). Entretanto, a máxima taxa de destruição das bactérias lácticas foi atingida com 24 horas; porém esses dados são conflitantes, uma vez que o teste foi realizado a 30°C e a esta temperatura a hidrólise do DEDC completa-se em 4 horas e o produto não apresenta mais efeito sobre os microrganismos.

Outra característica interessante a ser avaliada refere-se à composição do meio de suspensão dos microrganismos. SPLITTSTOESSER & WILKISON (1973) observaram o efeito do DEDC na sobrevivência de microrganismos, quando os mesmos foram colocados em diferentes meios de cultura. Segundo o autor, os microrganismos afetados pela exposição ao DEDC podem ser recuperados da injúria se forem colocados rapidamente em meios adequados.

Neste estudo, pode-se dizer que os microrganismos que sobreviveram, bem como aqueles que sofreram injúria sub-letal encontraram na carne um excelente

meio de cultura para sua recuperação, sendo responsáveis pela deterioração da carne de frango tratada.

Uma característica própria da carne de frango é a constituição das fibras musculares e gordura, que favorecem a fixação de microrganismos nas saliências e poros da pele (LILLARD, 1989; LILLARD, 1986; THOMAS & McMEEKIN, 1980). Esta característica pode impedir a penetração adequada de qualquer agente sanitizante.

Muitos microrganismos aderem-se ao redor das fibras de colágeno e ao material polissacarídico (BENEDICT et alii, 1991; BRYAN & DOYLE, 1995). Isto faz com que os microrganismos ligados à carne ou à pele sejam inacessíveis aos tratamentos bactericidas aplicados (BRYAN & DOYLE, 1995; CONNER & BILGILI, 1994).

Em função do exposto, a ação antimicrobiana do DMDC pode ter sido afetada, e o produto não ter eliminado completamente a flora microbiana da superfície da carne.

Outro aspecto a considerar, refere-se à reatividade do DMDC. Este produto reage prontamente com materiais protéicos presentes, o que pode acarretar uma redução da eficiência antimicrobiana nos tratamentos onde é aplicado (OUGH, 1983).

Como já foi relatado, a taxa de morte é proporcional à concentração de DMDC (OUGH, 1983). Assim, a redução do efeito letal com o emprego de baixas concentrações de DMDC pode ser explicado devido à capacidade de bactérias reproduzirem-se por curtos períodos de tempo antes de danos permanentes serem causados ao microrganismo ((SPLITTSTOESSER & WILKISON, 1973).

Como a principal ação antimicrobiana do DMDC ocorre no início do tratamento, é possível obter-se um aumento na vida-de-prateleira, partindo-se de

uma contagem inicial de 1 ou 2 log UFC/g em amostras submetidas ao tratamento com DMDC ao invés de 3 log UFC/g em amostras sem tratamento. Isto pode resultar em acréscimo de dois a quatro dias na vida-de-prateleira de filezinhos de peito de frango refrigerado.

Pode-se afirmar que o tratamento com o DMDC, aplicado nas condições ideais de concentração, destrói parcialmente a flora bacteriana da superfície da carne. Os microrganismos sobreviventes, livres da ação de competidores, terão condições de multiplicar-se mais rapidamente e deteriorar a carne estocada.

Os resultados deste experimento demonstraram também que o tempo de imersão do filé de peito de frango na solução de DMDC não afetou a eficiência da ação antimicrobiana. Isto confirma os dados obtidos nos testes preliminares com o DMDC, onde podem-se observar equivalentes reduções nas contagens de bactérias mesófilas, nas amostras submetidas ao tratamento de imersão por 15, 30 ou 60 segundos na solução do sanitizante.

Uma vez que o tempo de imersão não é um fator interferente, podemos verificar a importância desta resposta na aplicação do produto em uma linha de abate de frango, conforme anteriormente discutido.

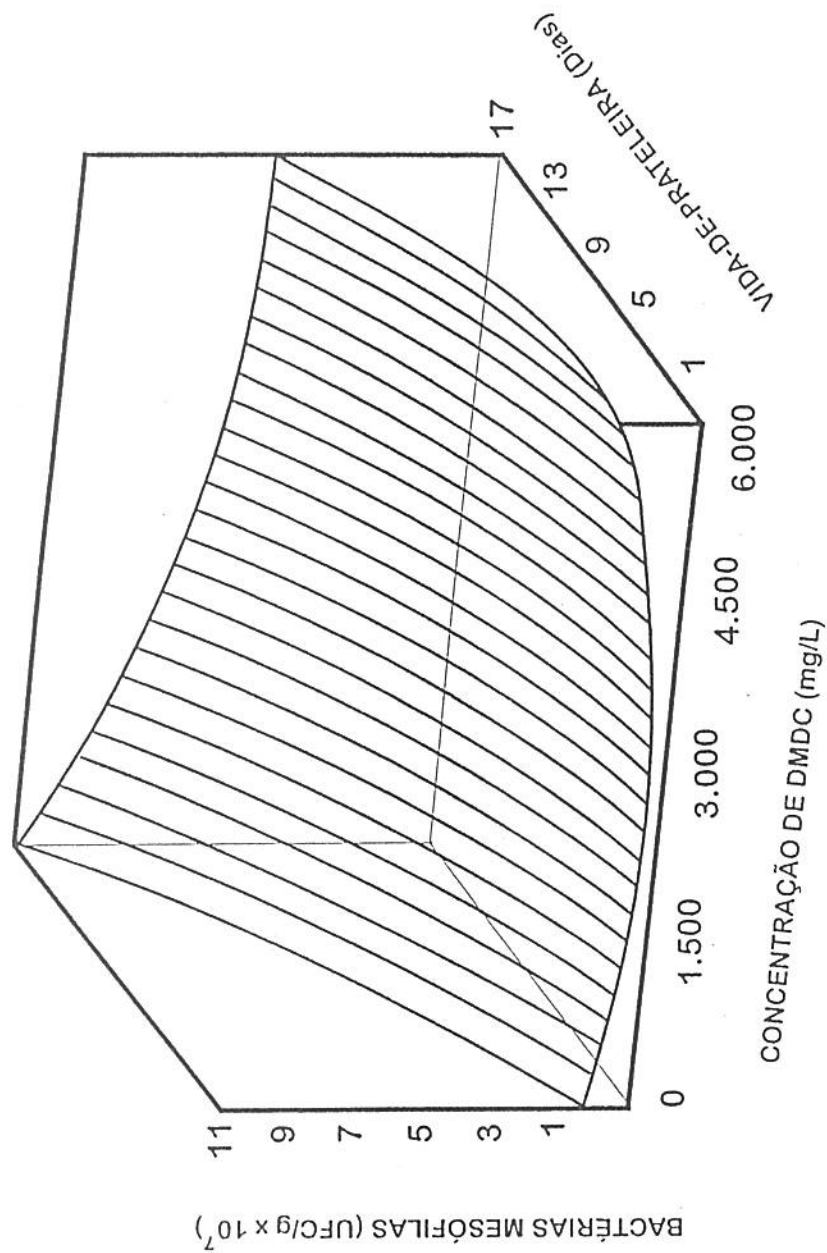


FIGURA 7. Superfície de resposta avaliando o efeito da concentração de dimetildicarbonato na vida-de-prateleira de filezinho de peito de frango refrigerado.

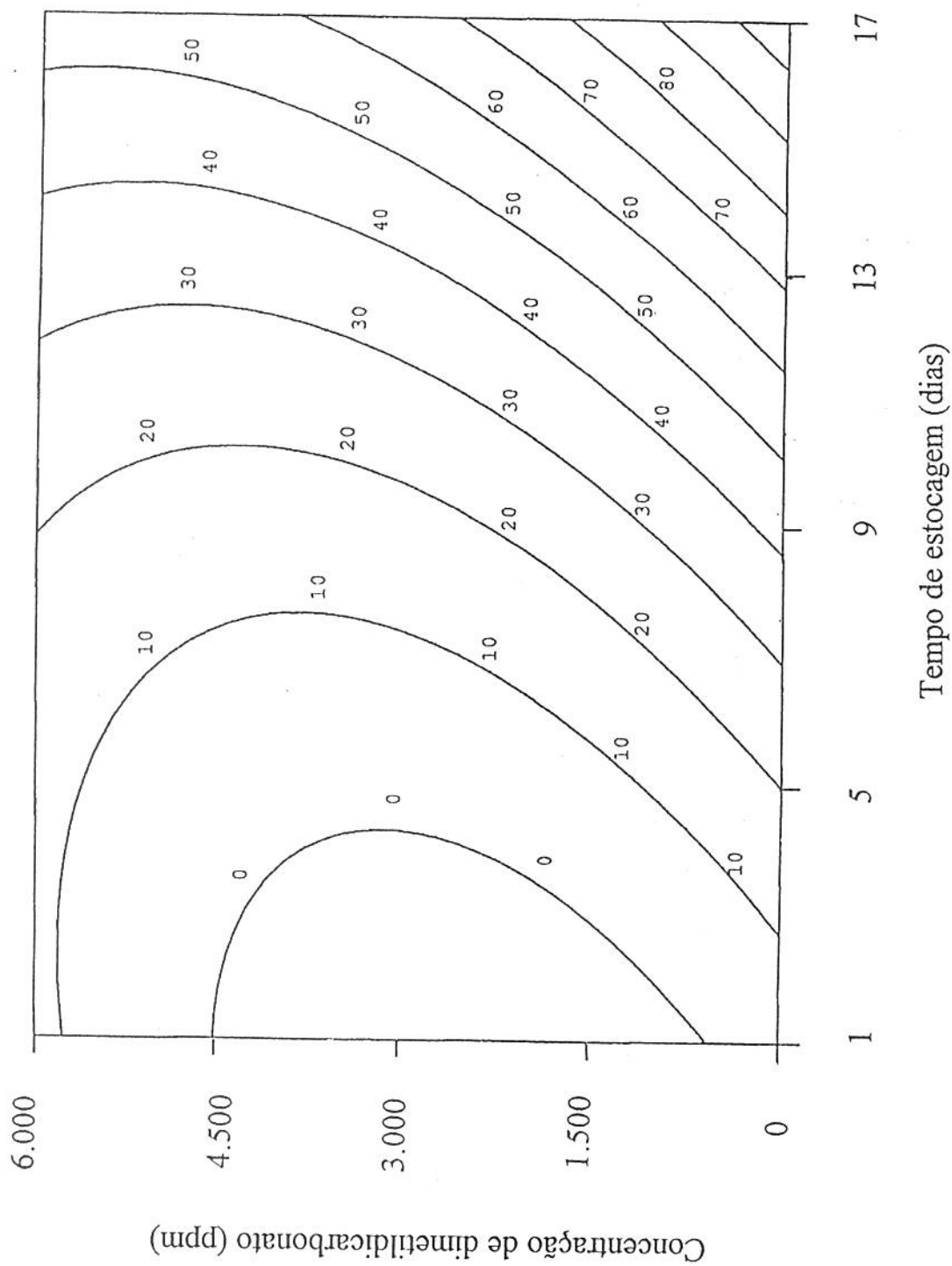


FIGURA 8. Curvas de nível mostrando o tempo de estocagem de filezinho de peito de frango em função da concentração de dimetildicarbonato.

TABELA 18. Previsões de crescimento bacteriano (log UFC/g) em filezinho de peito de frango para diferentes concentrações de dimetildicarbonato e tempos de estocagem; dados obtidos usando o modelo reduzido.

Concentração de DMDC (mg/L)	Tempo de estocagem (dias)																
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17				
0	4.040	4.337	4.601	4.840	5.057	5.257	5.443	5.616	5.779	5.931	6.076	6.213	6.343				
300	3.817	4.148	4.437	4.695	4.927	5.140	5.336	5.517	5.687	5.846	5.996	6.138	6.272				
600	3.578	3.949	4.267	4.546	4.795	5.021	5.227	5.417	5.595	5.761	5.916	6.063	6.202				
900	3.323	3.742	4.093	4.395	4.662	4.901	5.119	5.319	5.504	5.676	5.837	5.989	6.133				
1200	3.050	3.528	3.915	4.243	4.528	4.782	5.011	5.221	5.413	5.592	5.759	5.916	6.063				
1500	2.760	3.307	3.735	4.090	4.396	4.664	4.905	5.124	5.325	5.510	5.682	5.843	5.996				
1800	2.456	3.084	3.556	3.940	4.266	4.549	3.802	5.030	5.238	5.430	5.608	5.774	5.930				
2100	2.143	2.863	3.383	3.796	4.140	4.438	4.702	4.939	5.154	5.352	5.535	5.706	5.866				
2400	1.836	2.654	3.220	3.659	4.022	4.334	4.608	4.852	5.074	5.278	5.466	5.641	5.804				
2700	1.561	2.470	3.074	3.537	3.915	4.238	4.520	4.772	5.000	5.208	5.400	5.579	5.745				
3000	1.356	2.324	2.955	3.432	3.822	4.152	4.441	4.699	4.931	5.143	5.339	5.520	5.690				
3300	1.262	2.234	2.869	3.352	3.745	4.080	4.373	4.633	4.870	5.085	5.283	5.467	5.639				
3600	1.307	2.210	2.824	3.299	3.690	4.024	4.318	4.579	4.816	5.033	5.233	5.418	5.592				
3900	1.476	2.257	2.825	3.278	3.658	3.986	4.276	4.536	4.773	4.989	5.190	5.376	5.550				
4200	1.730	2.368	2.871	3.290	3.651	3.968	4.250	4.506	4.739	4.954	5.153	5.340	5.513				
4500	2.033	2.528	2.958	3.335	3.669	3.969	4.236	4.488	4.717	4.929	5.125	5.310	5.483				
4800	2.342	2.723	3.079	3.409	3.711	3.990	4.247	4.485	4.706	4.913	5.106	5.287	5.458				
5100	2.651	2.936	3.225	3.507	3.776	4.031	4.271	4.496	4.708	4.907	5.095	5.273	5.441				
5400	2.946	3.159	3.389	3.625	3.860	4.089	4.310	4.520	4.721	4.912	5.094	5.266	5.430				
5700	3.225	3.382	3.563	3.758	3.960	4.163	4.363	4.558	4.746	4.927	5.101	5.267	5.427				
6000	3.487	3.601	3.742	3.901	4.073	4.250	4.429	4.607	4.782	4.952	5.117	5.277	5.430				

4.5. Avaliação da ação do dimetildicarbonato (DMDC) em *Salmonella enteritidis* PT 4 inoculada artificialmente em filezinho de peito de frango.

A partir dos resultados obtidos no experimento anterior, definiu-se a concentração de 4.500 ppm como o nível ótimo de aplicação do DMDC em filezinho de peito de frango. Como o tempo de imersão não foi considerado um fator interferente, optou-se pelo tratamento de imersão na solução de DMDC por 30 segundos.

Numa primeira etapa, empregou-se a melhor concentração de DMDC - 4.500 ppm definida pela aplicação da metodologia Superfície de resposta. Procurou-se, numa segunda fase, avaliar o efeito da concentração mais elevada de DMDC a 6.000 ppm, sobre a cepa de *Salmonella enteritidis* PT4. A eficiência do DMDC na eliminação de *S. enteritidis* PT4 durante a estocagem dos filezinhos de peito de frango, submetidos ao tratamento, foi testada através da pesquisa do microrganismo em 5 filezinhos por tratamento, comparando-se àqueles que não receberam qualquer tratamento e foram utilizados como controle.

Os filezinhos, contendo sua flora normal, foram imersos na suspensão de *S. enteritidis*, sendo este o modelo escolhido preferencialmente à carne com cultura pura do microrganismo. Este modelo assemelha-se às condições da superfície da carne durante o processamento normal em um abatedouro e foi utilizada no sentido de evitar uma falsa atividade antimicrobiana do sanitizante; fatores como interações microbianas e natureza dos microrganismos contaminantes podem interferir na eficácia antimicrobiana de sanitizantes.

Em muitas pesquisas onde se pretende avaliar a eficiência antimicrobiana de sanitizantes é comum partir-se de inóculos tão elevados quanto

10^7 a 10^8 células/mL do microrganismo a ser testado. Tal situação pode muitas vezes não ser comparada à realidade, como por exemplo o que acontece com a água de resfriamento de carcaças, onde contagens de *Salmonella* dessa ordem não são esperadas.

Em nossos estudos, contaminamos os filezinhos de peito de frango com níveis de *Salmonella* da ordem de 50 células / filé, visando estudar a influência do DMDC nas condições da carne obtida em uma linha de produção de frango.

Na **Tabela 19** observa-se a incidência de *Salmonella* em filezinho de peito de frango contaminado artificialmente com o microrganismo, em função dos tratamentos à que os mesmos foram submetidos: 4.500 ppm e 6.000 ppm de DMDC.

TABELA 19. Incidência de *Salmonella enteritidis* PT4 em filezinho de peito de frango submetido a tratamento em solução à 4.500 ppm dimetildicarbonato¹.

Tempo de estocagem	Tratamento				
	Controle	4.500 ppm sem agitação	4.500 ppm com agitação	6.000 ppm sem agitação	6.000 ppm com agitação
4 horas	100 %	40 %	40 %	80 %	20 %
1 dia	100 %	100 %	40 %	40 %	80 %
7 dias	60 %	20 %	0 %	60 %	0 %
13 dias	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

* Média de 2 ensaios.

¹ Utilizaram-se 5 filezinhos de peito de frango por análise.

Após 4 horas de estocagem a 4°C foram encontradas salmonelas em 100% das amostras controle. Porém, diferentes níveis de recuperação foram observados em função dos diferentes tratamentos . Quando os filés foram submetidos a tratamentos de imersão em solução de DMDC a 4.500 ppm, a recuperação de salmonelas foi observada em 40% das amostras, independentemente de agitação ou não do banho de imersão. Com a concentração de 6.000 ppm de DMDC, a recuperação do microrganismo foi observada em 80% das amostras submetidas ao tratamento sem agitação e em somente 20% daqueles tratados com agitação.

Após um dia de estocagem à 4°C, foi possível recuperar-se salmonelas novamente em 100% das amostras controle. Com o emprego de DMDC a 4.500 ppm recuperou-se o microrganismo em 100% e 40% das amostras tratadas sem agitação e com agitação do banho, respectivamente.

Já com o emprego de DMDC a 6.000 ppm o microrganismo foi recuperado em 40% e 80% das amostras tratadas sem agitação e com agitação do banho de imersão, respectivamente.

Após 7 dias de estocagem a 4°C ainda foram recuperadas salmonelas em 60% das amostras controle e em 20% das amostras tratadas com DMDC a 4.500 ppm sem agitação; já nas amostras com agitação observou-se a destruição total do microrganismo.

Nas amostras submetidas ao tratamento com 6.000 ppm de DMDC, foram recuperadas salmonelas em 60% daquelas tratadas sem agitação. Também neste caso, observou-se a total destruição do microrganismo nas amostras tratadas com agitação.

Quando utilizou-se a concentração de 6.000 ppm de DMDC, provavelmente a destruição de bactérias foi maior do que com o tratamento a

4.500ppm; isto permitiu que os microrganismos sobreviventes pudessem multiplicar-se mais rapidamente devido à eliminação dos competidores.

Após 13 dias de armazenamento a 4°C, o microrganismo esteve ausente nas amostras controles e tratadas com o DMDC, demonstrando que a simples estocagem dos filezinhos a 4°C destrói as salmonelas.

Pela **Figura 9** pode-se visualizar melhor o efeito do tratamento aplicado em filezinho de peito de frango.

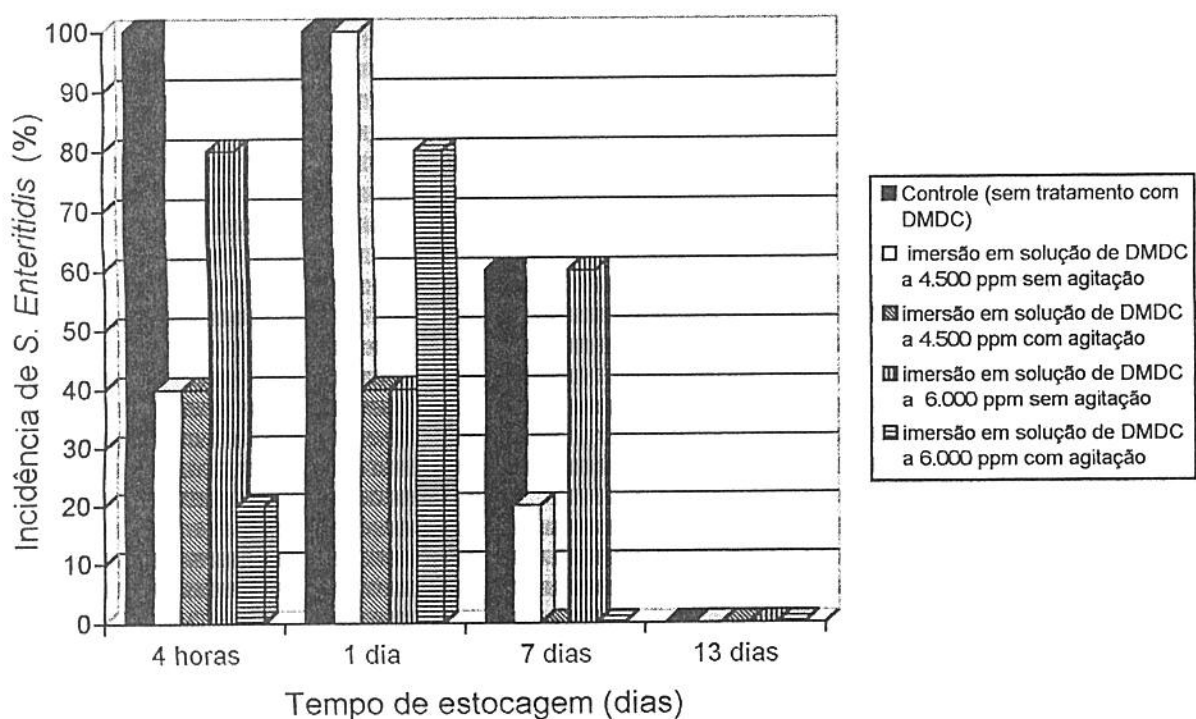


FIGURA 9. Incidência de *Salmonella enteritidis* PT4 em filé de peito de frango refrigerado submetido a tratamento com dimetildicarbonato (DMDC)

A eficiência do tratamento com solução de DMDC a 6.000 ppm com agitação do banho foi maior nas primeiras horas sendo observadas reduções de *Salmonella* em 80% dos filezinhos após 4 horas de estocagem a 4°C e em somente

20% dos mesmos após 1 dia; a destruição total dos microrganismos inoculados, foi observada após 7 dias de estocagem a 4°C, enquanto observou-se 60% das amostras-controle positivas para *Salmonella* neste dia.

O tratamento com DMDC à 6.000 ppm sem agitação do banho mostrou que a redução de salmonelas foi pequena durante toda a estocagem, sugerindo baixa eficiência bactericida nestas condições.

A eficiência bactericida do tratamento foi elevada, quando empregou-se uma solução de DMDC à 4.500 ppm, principalmente nas amostras com agitação do banho. A redução do microrganismo foi observada em 60% das amostras após 4 horas e 1 dia de estocagem a 4°C. Foi constatada a destruição total das salmonelas em todas as amostras, após 7 dias de estocagem a 4°C, enquanto observou-se 60% das amostras controle positivas para *Salmonella* neste dia.

Concluiu-se, portanto, que o efeito sinérgico da ação do sanitizante e do frio podem destruir completamente as salmonelas presentes nas superfícies de filezinhos de peito de frango submetidos ao tratamento a 4.500 ppm de DMDC, com agitação do banho.

A agitação favoreceu o equilíbrio das concentrações de DMDC na solução e na superfície das partes de frango, o que aumentou a eficiência antimicrobiana do produto; isto somado à ação do frio, provocou um efeito sinérgico na destruição de *S. enteritidis*.

Os resultados evidenciam a eficiência do tratamento com DMDC a 4.500 ppm na eliminação de microrganismos, comprovando o observado no experimento sobre a otimização da concentração de DMDC.

Algumas pesquisas relataram que a diminuição do pH do meio de tratamento favorece a ação esterilizante do dimetildicarbonato (DMDC) (OUGH et alii, 1978).

O emprego de DMDC juntamente com outros tratamentos, tais como ácido láctico, sórbico, acético, peróxido de hidrogênio, entre outros, poderiam ser testados visando obter um efeito sinérgico na redução da flora de microrganismos deterioradores ou patogênicos na superfície de carne de frango.

4.6. Avaliação Sensorial de peito de frango submetido a tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato

Nas figuras de 10 a 15 são apresentados os resultados dos atributos avaliados na análise sensorial de peito de frango submetido a tratamento com DMDC. No **Anexo C** pode-se observar os valores médios e os respectivos desvio-padrão.

Odor

Pelos resultados apresentados nas **Figuras 10 e 11**, observaram-se respectivamente, os valores médios para o tipo e intensidade de odor visando verificar a influência que o tratamento com DMDC a 4.500 ppm exerceu sobre estes parâmetros durante a estocagem de peito de frango refrigerado.

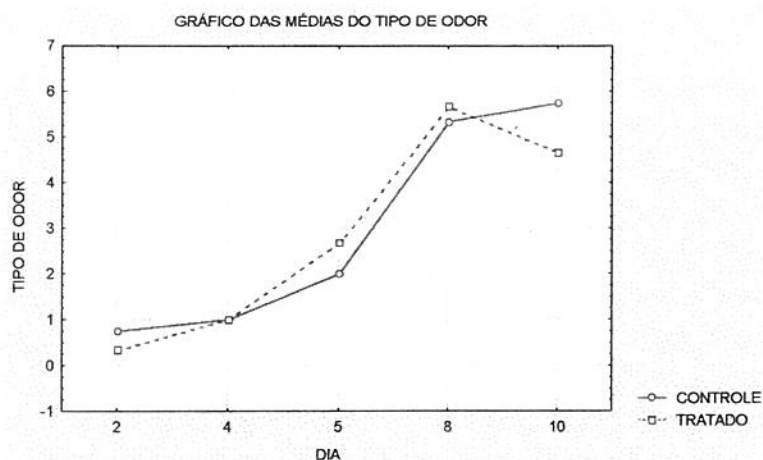


FIGURA 10. Resultados dos atributos de tipo de odor, para as amostras controle e tratadas, durante a estocagem.

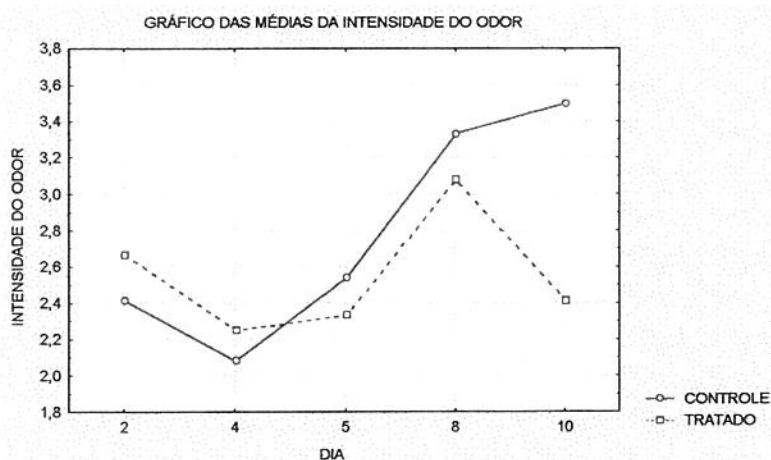


FIGURA 11. Resultados dos atributos de intensidade de odor, para as amostras controle e tratadas, durante a estocagem.

Em relação ao tipo de odor, os provadores identificaram, a partir do segundo dia de armazenamento, odor de tempero de alho (0) em algumas amostras, tanto tratadas como controle; este odor pode ser explicado em função da ração dada aos frangos.

Contudo observou-se odor normal (1) até o quarto dia de estocagem. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as amostras submetidas ao tratamento e os controles para o mesmo dia de avaliação; isto foi observado até o final da vida-de-prateleira.

A intensidade do odor detectada pela equipe, oscilou em média entre 2 (ligeiro) e 3,5 (moderado/intenso), ao longo dos dias de estocagem. Porém, os escores dos peitos submetidos a tratamento foram significativamente menores que os do controle e esta variação foi observada após o quinto dia de estocagem.

Na **Figura 12** observou-se os valores médios para o parâmetro aceitação do odor. Pode-se observar que a média de aceitação do odor, de 1,5, deve ter sido atingida no 7º dia, tanto para as amostras controle quanto para as tratadas, determinando o final da vida de prateleira, nas condições deste experimento.

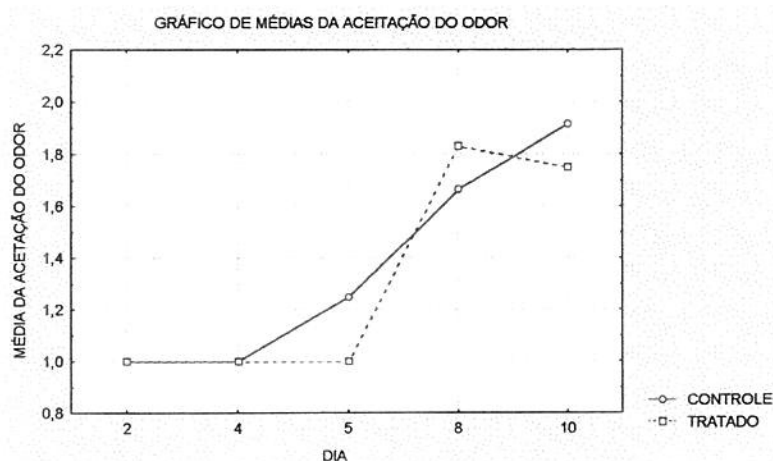


FIGURA 12. Resultados médios da aceitação do odor das amostras controle e tratadas, durante a estocagem.

Foi detectada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) durante a estocagem para a aceitação do odor, tanto nas amostras tratadas como nos controles; isto era esperado devido ao odor putrido / fermentado observado em quaisquer amostras no final da vida-de-prateleira, o 8º dia. Não foi detectada

diferença significativa ($p > 0,05$) em relação a este parâmetro, entre as amostras submetidas a tratamento com DMDC e os controles, durante a estocagem.

Cor da gordura

Em relação à avaliação sensorial da cor da gordura da pele, pode-se observar na **Figura 13** os valores médios obtidos para este parâmetro. Estes resultados mostraram que os escores para a cor da gordura oscilaram entre amarelo (3) e amarelo esbranquiçado (2), tanto nas amostras controle como nas tratadas; não foi observado diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre as amostras ao longo da estocagem.

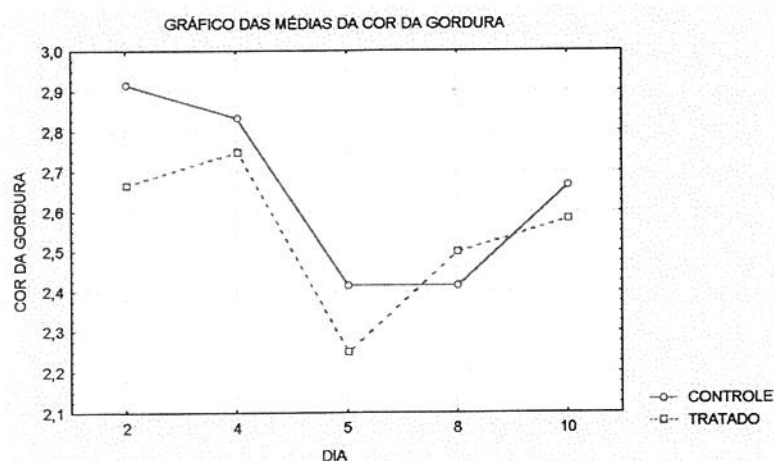


FIGURA 13. Resultados médios da cor da gordura das amostras controle e tratadas, durante a estocagem .

Cor do músculo e uniformidade

Nas **Figuras 14 e 15** pode-se observar os escores médios para uniformidade da cor e cor do músculo para peito de frango.

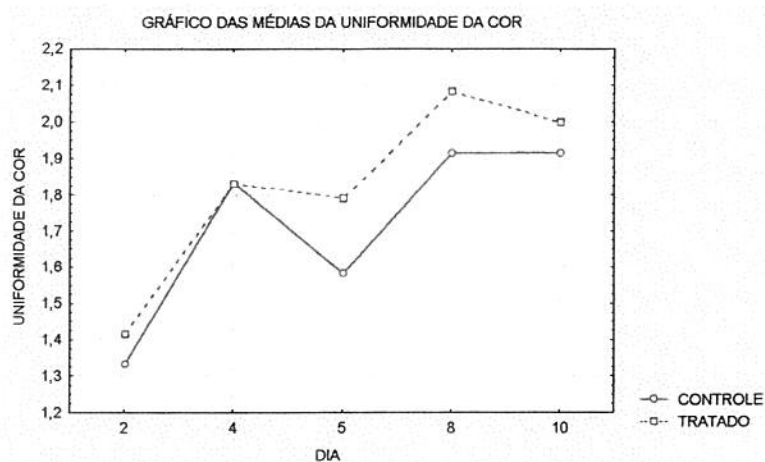


FIGURA 14. Resultados médios da uniformidade da cor do músculo das amostras controle e tratadas, durante a estocagem.

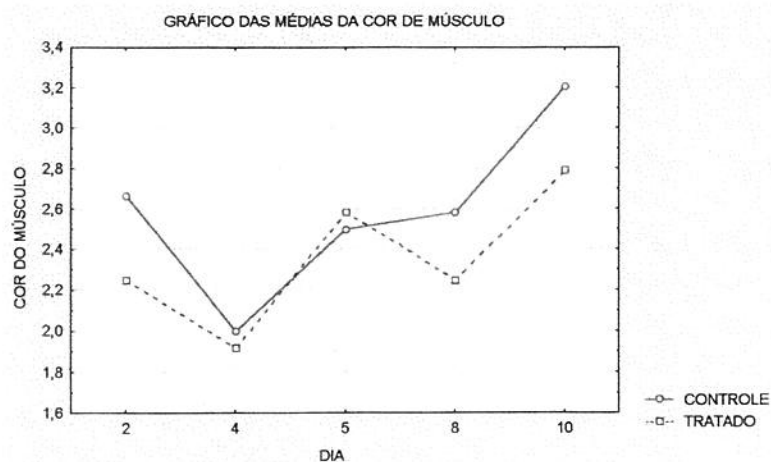


FIGURA 15. Resultados médios da cor do músculo das amostras controle e tratadas, durante a estocagem.

A cor observada, tanto nas amostras submetidas a tratamento como nos controles variou entre róseo amarelado, róseo e rosa pálido. As amostras tratadas apresentaram coloração tendendo ao amarelado; porém as diferenças não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre os escores atribuídos à uniformidade da cor das amostras tratadas e controle.

Os escores em relação à uniformidade da cor variaram entre uniforme (1) e ligeiramente desuniforme (2), ao longo da estocagem.

Estes resultados sugerem que o tratamento de imersão em solução a 4.500 ppm de DMDC não exerceu influência sobre os atributos pesquisados.

4.7. Determinações físico-químicas em peito de frango submetido a tratamento de imersão em solução de dimetildicarbonato.

Avaliação da cor do músculo pelo sistema CIE $L^*.a^*.b^*$.

Nas **Figuras 16 a 18** são apresentados, respectivamente, os resultados médios da cor de peito de frango mensurada pelo sistema CIE $L^*.a^*.b^*$. No **Anexo D** podem-se observar os valores médios e os respectivos desvios-padrão.

Os valores de L (Figura 16) variaram de 46,80 a 50,80 para as amostras controle e 48,1 a 46,9 para aquelas submetidas ao tratamento. As amostras tratadas apresentaram valores relativamente maiores de luminosidade (L^*) após 2 dias de estocagem, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) quando comparada às amostras-controle.

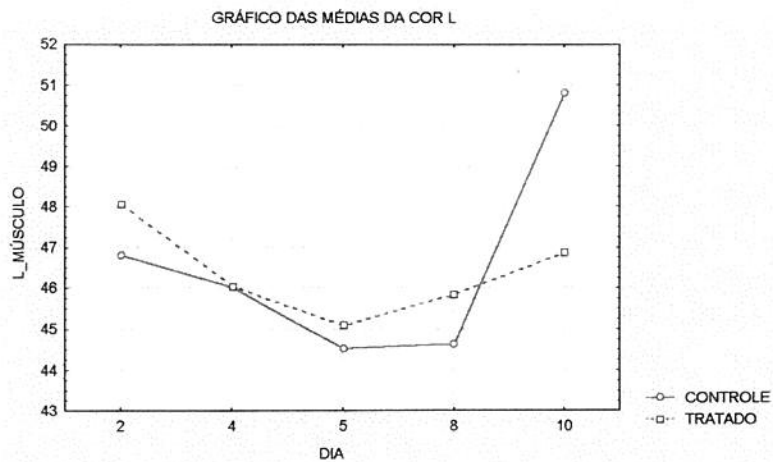


FIGURA 16. Resultados médios da cor L* do músculo entre as amostras controle e tratadas, durante a estocagem.

Os valores de vermelho (a*) (Figura 17) oscilaram entre 0,53 a 1,05 para as amostras controle e de 0,77 a 1,33 para aquelas submetidas ao tratamento com DMDC.

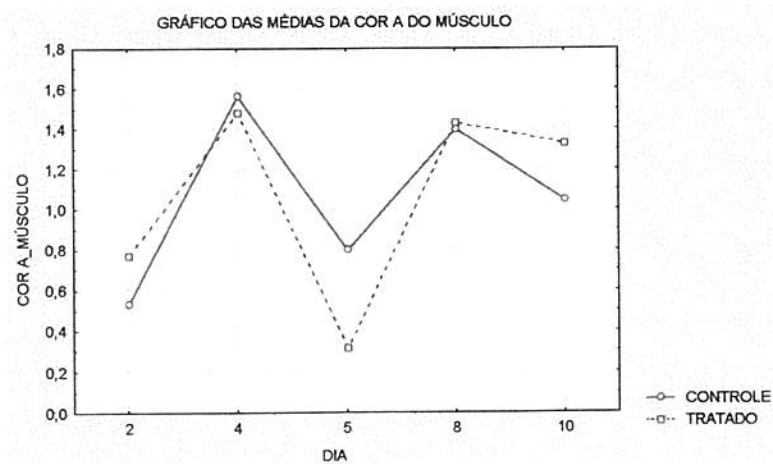


FIGURA 17. Resultados médios da cor a* do músculo entre as amostras controle e tratadas, durante a estocagem.

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre as amostras controle e as tratadas em cada dia de análise, para a intensidade da cor vermelha. Porém diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas ao longo da estocagem.

Os valores da cor amarela (b^*) (Figura 18) variaram de 6,26 a 7,68 para as amostras controle e de 6,85 a 6,65 para as tratadas.

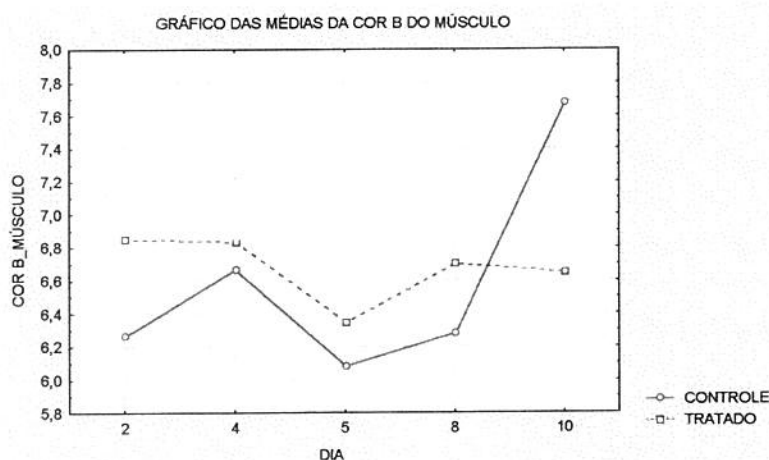


FIGURA 18. Resultados médios da cor b^* do músculo das amostras controle e tratadas, durante a estocagem.

Para os valores de amarelo não foram observadas diferenças significativas entre as amostras controle e aquelas submetidas ao tratamento. O valor de b^* apresentou-se alterado apenas no 10º dia de estocagem nas amostras controle. Os valores de b^* das amostras tratadas mantiveram-se constantes ao longo da estocagem.

Avaliação do pH na superfície do músculo

Os valores médios de pH encontrados na superfície do músculo de peito de frango são mostrados na **Figura 19**; no **Anexo D** encontram-se os valores médios e desvio-padrão para este parâmetro. Dois dias após o tratamento com DMDC o pH superficial dos músculos sofreu ligeira elevação para 5,81, enquanto o pH dos controles foi de 5,55.

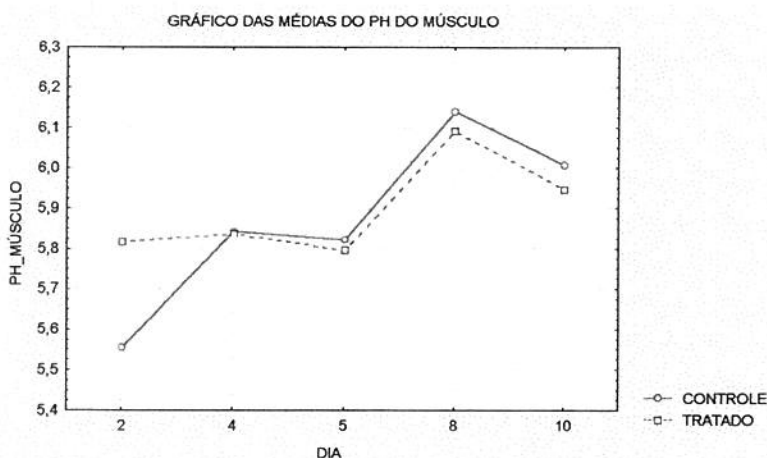


FIGURA 19. Resultados médios do pH na superfície do músculo das amostras controle e tratadas, durante a estocagem

Após o 4º dia e até o final da vida-de-prateleira, não observou-se diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de pH da superfície dos músculos tratado e os controles.

Avaliação do pH na superfície da pele

Os valores médios de pH encontrados na superfície da pele dos peitos de frango são mostrados na **Figura 20**; no **Anexo D** encontram-se os valores médios e desvio-padrão para este parâmetro. Os valores de pH determinados neste ensaio, seguiu tendência semelhante aos valores de pH do músculo. Dois dias após o tratamento com DMDC o pH superficial da pele sofreu ligeira elevação para 5,84, enquanto o pH dos controles foi de 5,68.

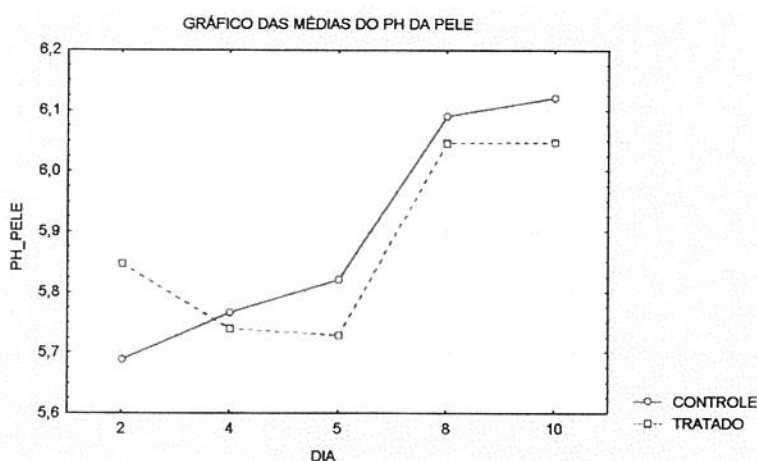


FIGURA 20. Resultados médios do pH na superfície da pele das amostras controle e tratadas, durante a estocagem

Após o 4º dia e até o final da vida-de-prateleira, não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores de pH da pele dos peitos tratados e os controles.

A avaliação destes resultados sugere que após dois dias de armazenamento refrigerado, o tratamento aplicado não exerceu influência no pH do músculo e da pele.

5. CONCLUSÕES

1. A sanitização da carne de frango pela imersão em solução de dimetildicarbonato (DMDC) reduziu significativamente as contagens microbianas na superfície da carne de frango em 1 a 2 ciclos logarítmicos.

2. O DMDC foi mais eficiente no controle da taxa de crescimento das bactérias mesófilas, quando empregado em concentrações mais elevadas.

3. O nível ótimo para aplicação do DMDC em filezinho de peito de frango foi de 4.500 ppm, sendo que, nesta concentração, as contagens tanto de bactérias deterioradoras como de patogênicas foram reduzidas.

4. O tempo de imersão dos filés na solução de DMDC, no intervalo de 15 a 75 segundos, não afeta a taxa de crescimento das bactérias aeróbias mesófilas.

5. O emprego de agitação no tratamento de filezinhos de peito de frango com DMDC melhora a eficiência antimicrobiana do sanitizante na destruição de *Salmonella*.

6. O tratamento de peito de frango com 4.500 ppm de DMDC, durante 30 segundos, não afeta as qualidades sensoriais como cor da pele e do músculo, além de odor da carne; também não altera o pH da superfície da carne de frango.

7. O DMDC apresenta potencial para ser empregado no processamento de frangos em carcaça ou em partes, pois prolonga a vida de prateleira de filezinho de peito de frango por cerca de 2 a 4 dias (20 - 50%)

6. SUGESTÕES

1. Quanto menor o volume de DMDC a ser aplicado e menor o tempo necessário para exercer seu efeito antimicrobiano, maiores facilidades serão encontradas na sua aplicação para o tratamento de frango na linha de processamento.

2. O DMDC pode ser aplicado na forma de banho em uma linha de produção, logo após o “chiller” para o caso de carcaças e logo após o espostejamento para o caso de partes. A utilização de vibração no banho permite o equilíbrio de concentrações do sanitizante entre o banho e a superfície das carcaças ou partes de frango.

3. Como trabalhos de continuidade, sugerimos estudar o efeito sinérgico das combinações de tratamentos de imersão em DMDC com ácidos orgânicos, tais como, láctico, cítrico e sórbico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALTEKRUSE, S.F., TOLLEFSON, L.K., BÖGEL, K. Control strategies for *Salmonella enteritidis* in five countries. **Food Control**, v.4, p.10-6, 1993.
2. AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION COMMITTEE. Guidelines for meat color evaluation. In: ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 44., Manhattan, 1991. **Proceedings...** Manhattan, 1991. p.2-17.
3. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Teste de análise descritiva quantitativa (ADQ) em análise sensorial de alimentos e bebidas*. Rio de Janeiro: ABNT, 1995. 12p.
4. BAILEY, C., JAMES, S. J. Design, performance and operation of chilling systems. Symposium: Status and Prospects for control of *Salmonella* of poultry. Athens, Geogia: USDA-Agricultural Research Service, 1986. p.131
5. BANWART, G. J. *Basic food microbiology*. Westport: Avi, 1979. p.524.
6. BARROS NETO, B. de, SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*. Campinas, Ed. UNICAMP, 1995, 229 p. (Série Manuais).
7. BASSOI, L. J. Tratamento de águas residuais. In: ABATE e processamento de frangos. Campinas: APINCO, 1994. p.1-12
8. BAUTISTA, D. A., VAILLANCOURT, J. P., CLARKE, R. A., RENWICK,

- S., GRIFFITHS, M. W. Adenosine triphosphate bioluminescence as a method to determine microbial levels in scald and chill tanks at a poultry abattoir. **Poult. Sci.**, v.73, p.1673-8, 1994.
9. BAYER, A.G., 51373 Leverkusen. O. Exner, M. Kugler, M. Hoffmann. Dimethyl dicarbonate/potassium sorbate/ascorbic acid combination for sterilization of carbonated and non carbonated beverages. DE 4434 314A1, 26.09.94. GERMAN FEDERAL REPUBLIC APPLICATION, 1996.
 10. BEAN, N. H., GRIFFIN, P. M. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles and trends. **J. Food Prot.**, v.53, p.804-17, 1990.
 11. BENEDICT, R. C., SCHULTZ, F. J., JONES, S. B. Attachment and removal of *Salmonella* spp. on meat and poultry tissues. **J. Food Saf.**, v.11, p.135-48, 1991.
 12. BERAQUET, N. J. Industrialização da carne de aves. In: INDUSTRIALIZAÇÃO da carne de frango. Campinas: CTC, 1992. p.72-8.
 13. BERAQUET, N.J. Abate e evisceração. In: ABATE e processamento de frangos. Campinas: APINCO, 1994. p.19-24.
 14. BIO-ADD O aditivo essencial para controle de *Salmonella*. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, APINCO, 1992, Campinas. Anais... Campinas: FACTA, 1992.
 15. BLANKENSHIP, L. C., COX, N. A. Modified water rinse sampling for sensitive, non-adulterating *Salmonella* detection on eviscerated broiler

carcasses. **J. Milk Food Technol.**, v.10, p.680-1, 1976.

16. BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building. New York: John Wiley, 1978, p. 239.
17. BREWER, R. L., JAMES, W.O., PRUCHA, J. C., JOHNSTON, R. W., ALVAREZ, C. A., KELLY, W., BERGERON, E. A. Poultry processing line speeds as related to bacteriologic profile of broiler carcasses. **J. Food Sci.**, v.60, p.1022-4, 1995.
18. BRYAN, F. L., DOYLE, M. P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **J. Food Prot.**, v.58, p.326-44, 1995.
19. CHANG, S. Y., TOLEDO, R. T., LILLARD, H. S. Classification and decontamination of poultry chiller water for recycling. **Poult. Sci.**, v.68, p.1100-08, 1989.
20. CLOUSER, C. S., KNABEL, S. J., MAST, M. G., DOORES, S. Effect of type of defeathering system on *Salmonella* cross-contamination during commercial processing. **Poult. Sci.**, v.74, p.732-41, 1995.
21. CONNER, D. E., BILGILI, S. F. Skin attachment model for improved laboratory evaluation of potential carcass disinfectants for their efficacy against *Salmonella* attached to broiler skin. **J. Food Prot.**, v.57, p.684-8, 1994.
22. COSTILOW, R. N., VEBERSAX, M. A., WARD, P. L. Use of chlorine dioxide for controlling microorganisms during the handling and storage of fresh cucumbers. **J. Food Sci.**, v.49, p.396-401, 1984.

23. COX, N. A. *Salmonella* methodology update. **Poult. Sci.**, v.67, p.921-7, 1988.
24. COX, N. A., BLANKENSHIP, L. C. Comparison of rinse sampling methods for detection of *Salmonella* on eviscerated broiler carcasses. **J. Food Sci.**, v.40, p.1333-4, 1975.
25. COX, N. A., THOMSON, L. E, BAILEY, L. S. Sampling of broiler carcasses for *Salmonella* with low volume water rinse. **Poult. Sci.**, v.60, p.768-70, 1981.
26. COX, N. A., MERCURI, A. J., TANNER, D. A., CARSON, M. O., THOMSON, J. E, BAILEY, J. S. Effectiveness of sampling methods for *Salmonella* detection on processed broilers. **J. Food Prot.**, v.41, p.341-3, 1978.
27. CUNNINGHAM, F. E. Microbiological aspects of poultry and poultry products: an update. **J. Food Prot.**, v.45, p.1149-64, 1982.
28. DAUDT, C.E., OUGH, C.S. Action of dimethyldicarbonate on various yeasts. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.31, p.21-3, 1980.
29. DAVIS, J.G. Preservation of beer. **Process. Biochem.**, v.7, p.32-4, 1972.
30. DICKENS, J.A., COX, N. A., BAILEY, J. S., THOMSON, J. E. Automated microbiological sampling of broiler carcasses. **Poult. Sci.**, v.64, p.1116-20, 1985.
31. DICKSON, J. S. Control of *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 on beef in a model spray chilling

system. **J. Food Sci.**, v.56, p.191-3, 1991.

32. DOYLE, M. P. Reducing foodborne disease what are the priorities? **Nutr. Rev.**, v.51, p.346-7, 1993.
33. DUBBERT, W. H. Assessment of *Salmonella* contamination in poultry: past, present and future. **Poult. Sci.**, v.67, p.944-9, 1988.
34. EMSWILLER-ROSE, B., KOTULA, A. W. Inhibition of bacterial growth by two chlorine sources in a model system. **J. Food Sci.**, v.49, p.931-3, 1984.
35. ENTIS, P. Rapid hydrofobic grid membrane filter method for *Salmonella* detection in selected foods: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.68, p.555-64, 1985.
36. ENTIS, P., BOLESZCZUK, P. Rapid detection of *Salmonella* in foods using EF-18 agar in conjunction with the hydrophobic grid membrane filter. **J. Food Prot.**, v.54, p.930-4, 1991.
37. ENTIS, P. BRODSKY, M.H., SHARPE, A.N., JARVIS, G.A. Rapid detection of *Salmonella* in food by use of the ISO-GRID hydrofobic grid membrane filter. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.43, p.261-8, 1982.
38. FINE, S.D. Food additives permitted in food for human consumption diethyl pyrocarbonate. **Fed. Reg.**, v.37, p.15426, 1972.
39. FITTS, R. DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* sp in foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.46, p.1146-51, 1983.
40. FLOWERS, R. Comparison of rapid *Salmonella* screening methods and the conventional culture method. **Food Technol.**, v.39, p.103-8, 1985.

41. FLOWERS, R. S. Enzyme immunoassay for detection of *Salmonella* in foods: collaborative study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v.69, p.786-98, 1986.
42. FOEGEDING, P. M., HEMSTAPAT, V., GIESBRECHT, F. G. Chlorine dioxide inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spores. **J. Food Sci.**, v.51, p.197-201, 1986.
43. FU, AN-H., SEBRANEK, J. G., MURANO, E. A. Survival of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *E. coli* O157:H7 and quality changes after irradiation of beef steaks and ground beef. **J. Food Sci.**, v.60, p.972-7, 1995.
44. GENTH, H. Diethyldicarbonate, a non permanent additive in beverages. **Gordian**, v.71, p.255-6, 1971.
45. GENTH, H. Dimethyldicarbonat: ein neuer verschwindestoff. **Brauerei J.**, v.6, p.129-33, 153, 1980.
46. GENTH, H. Dimethyldicarbonate: a new labile sterilant for non-alcoholic, fruit juice containing soft drinks. **Erfrischungsgetraenk**, v.32, p.262-9, 1979.
47. GIESE, J. *Salmonella* reduction process receives approval. **Food Technol.**, v.47, p.110, 1993.
48. GIESE, J. Sanitation: the key of food safety and public health. **Food Technol.**, v.45, p.74-80, 1991.
49. GILL, C. O., HARRISON, J.C.L., PENNEY, N. The storage life of chicken

carcasses packaged under carbon dioxide. **Int. J. Food Microbiol.**, v.11, p.151-7, 1990.

50. GIORGI, W. Animais domésticos como portadores de salmonelas: significado epidemiológico e sua relação com a saúde pública. **Hig. Alim.**, v.1, p.177-93, 1982.
51. GUTHRIE, R. K. *Food Sanitation*. 3.ed. Westport: Avi, Van Nostrand Reinhold, 1988. p.123-39.
52. HARAKEH, S., ILLESCAS, A., MATIN, A. Inactivation of bacteria by Purogene. **J. Appl. Bacteriol.**, v.64, p.459-63, 1988.
53. HARGIS, B.M., CALDWELL, D.J., BREWER, R.L., CORRIER, D.E., DELOACH, J.R. Evaluation of the chicken crop as a source of *Salmonella* contamination for broiler carcasses. **Poult Sci.**, v.74, p.1548-52, 1995.
54. HATHCOX, A.K., HWANG, C.A., RESSURRECION, A.V.A., BEUCHAT, L.R. Consumer evaluation of raw and fried chicken after washing in trisodium phosphate or lactic acid/sodium benzoate solutions. **J. Food Sci.**, v.60, p.604-5, 1995.
55. HAWA, S. G., MORRISON, G. J., FLEET, G. H. Method to rapidly enumerate *Salmonella* on chicken carcasses. **J. Food Prot.**, v.47, p.932-7, 1984.
56. HINTON, M.H. Infecções causadas por *Salmonella* em aves e seus respectivos controles. In: CONFERÊNCIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1992, Campinas. **Anais...Campinas: FACTA**, 1992. p.119-22.

57. HOLBROOK, R., ANDERSON, J.M., BAIRD-PARKER, A.C. Rapid detection of *Salmonella* in foods: a convenient two-day procedure. **Lett. Appl. Bacteriol.**, v.8, p.139-42, 1989.
58. HUMPHREY, T. J., LANNING, D. G., BERESFORD, D. The effect of pH adjustment on the microbiology of chicken scald-tank water with particular reference to the death rate of salmonellas. **J. Appl. Bacteriol.**, v.51, p.517-27, 1981.
59. HWANG, C.A., BEUCHAT, L.R. Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. *J. Food Prot.*, v.58, p.19-23, 1995.
60. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Microbial ecology of foods: food commodities*. 2.ed. Toronto: University of Toronto Press., 1980. v.2, p. 411-58.
61. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Meat and meat products: enumeration of micro-organism, colony count technique at 30°C*. Reference method. 2.ed., Switzerland, 1988. (International Standard ISO 2293).
62. JAMES, W.O., BREWER, R. L, PRUCHA, J. C., WILLIAMS, W. O., PARHAM, D.R. Effects of chlorination of chill water on the bacteriologic profile of raw chicken carcasses and giblets. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.200, p.60-3, 1992.
63. JAY, J.M. *Modern food microbiology*. 2.ed. New York: Van Nostrand, 1978. p.163-84.

64. JETTON, J. P., BILGILI, S. F., CONNER, D. E., KOTROLA, J. S., REIBER, M. A. Recovery of *Salmonella* from chilled broiler carcasses as affected by rinse media and enumeration method. **J. Food Prot.**, v.55, p.329-32, 1992.
65. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Evaluation of certain food additives and contaminants: thirty-seventh report of the Joint FAO/WHO, Expert Committee on Food Additives. Geneva: FAO/WHO, 1991. 48p. (WHO Technical Report Series, 806).
66. KAMAT, A. S., NAIR, M. P. Gamma irradiation as a means to eliminate *L. monocytogenes* from frozen chicken meat. **J. Sci.. Food Agric.**, v.69, p.415-22, 1995.
67. KAMAT, A. S., ALUR, M. D., NERKAR, D. P., NAIR, P. M. Hygienization of Indian chicken meat by ionizing radiation. **J. Food Saf.**, v.12, p.59-71, 1991.
68. KAMPELMACHER, E. H. Poultry disease and public health. **Brit. Poult. Sci.**, v.28, p.3-13, 1987.
69. LAMUKA, P. O., SUNKI, G. R., CHAWAN, C. B., RAO, D. R., SHACKELFORD, L. A. Bacteriological quality of freshly processed broiler chickens as affected by carcass pretreatment and gamma irradiation. **J. Food Sci.**, v.57, p.330-2, 1992.
70. LEWIS, S. J., CORRY, J. E. Survey of the incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in experimentally irradiated and in matched unirradiated raw chickens. **Int. J. Food Microbiol.**, v.12, p.257-62, 1991.

71. LI, Y., KIM, J. W. , SLAVIK, M. F., GRIFFIS, C.L., WALKER, J. T., WANG, H. *Salmonella typhimurium* attached to chicken skin reduced using eletrical stimulation and inorganic salt. **J. Food Sci.**, v.59, p.23-5, 1994.
72. LILLARD, H.S. Bactericidal effect of chlorine on attached salmonellae with and without sonication. **J. Food Prot.**, v.56, p.716-7, 1993.
73. LILLARD, H. S. Comparison of sampling methods and implications for bacterial decontamination of poultry carcasses by rinsing. **J. Food Prot.**, v.51, p.405-8, 1988.
74. LILLARD, H. S. Control of pH in generating chlorine dioxide for bactericidal use in poultry processing water. **J. Food Sci**, v.45, p.154-6, 1980a.
75. LILLARD, H. S. Decontamination of poultry skin by sonication. **Food Technol.**, v.48, p.72-3, 1994.
76. LILLARD, H. S. Effect on broiler carcasses and water of treating chiller water with chlorine or chlorine dioxide. **Poult. Sci.**, v.59, p.1761-6, 1980b.
77. LILLARD, H. S. Factors affecting the persistence of *Salmonella* during the processing of poultry. **J. Food Prot.**, v.52, p.829-32, 1989
78. LILLARD, H. S. Improved chilling systems for poultry. **Food Technol.**, v.36, p.58-62, 64-7, 1982.
79. LILLARD, H. S. Levels of chlorine and chlorine dioxide of equivalent bactericidal effect in poultry processing water. **J. Food. Sci.**, v.44, p.1594-

7, 1979.

80. LILLARD, H. S. Role of fimbriae and flagella in the attachment of *Salmonella typhimurium* to poultry skin. **J. Food Sci.**, v.51, p.54-6,65, 1986.
81. LILLARD, H. S., THOMSON, J. E. Efficacy of hydrogen peroxide as a bactericide in poultry chiller water. **J. Food Sci.**, v.48, p.125-6, 1983.
82. LILLARD, H.S., BLANKENSHIP, L.C., DICKENS, J.A. Effect of acetic acid on the microbiological quality of scald picked and unpicked broiler carcasses. **J. Food Prot.**, v.50, p.112-4, 1987.
83. LOFRÖTH, G., GEJVALL, T. Diethyl Pyrocarbonate: formation of urethan in treated beverages. **Science**, v.174, p.1248-50, 1971.
84. MAREL, G. M. van der, LOGTESTIJN, J. G. van der, MOSSEL, D. A. A. Bacteriological quality of broiler carcasses as affected by in-plant lactic acid decontamination. **Int. J. Food Microbiol.**, v.6, p.31-42, 1988.
85. MAREL, G. M. van der, VRIES, A. W. de, LOGTESTIJN, J. G. van, MOSSEL, D.A.A. Effect of lactic acid treatment during processing on the sensory quality and lactic acid content of fresh broiler chickens. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.24, p.11-6, 1989.
86. MEAD, G. C. Hygiene problems and control of process contamination. In: MEAD, C. G. (Ed.). *Processing of Poultry*. London: Elsevier, 1989. p.183-220.
87. MEAD, G. C. Problems of producing safe poultry: discussion paper. **J. Royal Soc. Med.**, v.86, p.39-42, 1993.

88. MEAD, G. C., HUDSON, W. R., HINTON, M. H. Microbiological survey of five poultry processing plants in the UK. **Brit. Poult. Sci.**, v.34, p.497-503, 1993.
89. MEAD, G. C., HUDSON, W. R., HINTON, M. H. Use of a marker organism in poultry processing to identify sites of cross-contamination and evaluate possible control measures. **Brit. Poult. Sci.**, v.35, p.345-54, 1994.
90. MENDONÇA, A. F., AMOROSO, T. L., KNABEL, S. J. Destruction of gram-negative food-borne pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane. **App. Environ. Microbiol.**, v.60, p.4009-14, 1994.
91. MINNICH, S. A. Enzyme immunoassay for detection of *Salmonella* in foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.43, p.877-83, 1982.
92. MORRISON, G. J., FLEET, G. H. Reduction of *Salmonella* on chicken carcasses by immersion treatments. **J. Food Prot.**, v.48, p.939-43, 1985.
93. MOYE, C. J., CHAMBERS, A. Poultry processing: an inovative technology for *Salmonella* control and shelflife extension. **Food Aust.**, v.43, p.246-9, 1991.
94. MULDER, R. W. A. W. Ionizing energy treatment of poultry. **Food Technol. Austr.**, v.36, p.418-20, 1984.
95. MULDER, R.W.A.W., BOLDER, N.M. Methods to reduce *Salmonella* contamination during processing of poultry. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SALMONELLA, 1984, New Orleans, USA. **Proceedings...**New Orleans, USA, Editora, 1984.

96. MULDER, R. W. A. W, HULST, M. C., BOLDER, N. M.- Research note: *Salmonella* decontamination of broiler carcasses with lactic acid, L-cysteine and hydrogen peroxide. **Poult. Sci.**, v.66, p.1555-7, 1987.
97. MULLERAT, J., KLAPES, N. A., SHELDON, B. W. Efficacy of Salmide®, a sodium chlorite-based oxy-halogen disinfectant, to inactivate bacterial pathogens and extend shelf-life of broiler carcasses. **J. Food Prot.**, v.57, p.596-603, 1994.
98. MULLERAT, J., SHELDON, B. W., KLAPES, N. A. Inactivation of *Salmonella* species and other food-borne pathogens with Salmide®, a sodium chlorite-based oxyhalogen disinfectant. **J. Food Prot.**, v.58, p.535-40, 1995.
99. NOTERMANS, S., KAMPELMACHER, E. H., VAN SCHOTHORST, M. Studies of different samplig methods for the determination of bacterial counts from frozen broilers. **J. Appl. Bacteriol.**, v.39, p.125-31, 1975.
100. OKAFOR, N. Preliminary microbiological studies on the preservation of palm wine. **J. Appl. Bacteriol.**, v.38, p.1-7, 1975.
101. OKREND, A.J., JOHNSTON, R. W., MORAN, A. B. Effect of acetic acid on the death rates at 52°C of *Salmonella newport*, *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* in poultry scald water. **J. Food Prot.**, v.49, p.500-3, 1986.
102. OUGH, C. S. Dimethyldicarbonate and Diethyldicarbonate. In: BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M. (Ed.) Antimicrobials in Foods. New York: Marcel Dekker, 1983. cap.10, p.299-325.

103. OUGH, C.S. Dimethyldicarbonate as a wine sterilant. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.26, p.130-3, 1975.
104. OUGH, C.S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I.: naturally occurring ethylcarbamate. **J. Agric. Food Chem.**, v.24, p.323-8, 1976a.
105. OUGH, C.S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. II.: possible formation of ethylcarbamate from diethyldicarbonate addition to wine. **J. Agric. Food Chem.**, v.24, p.328-31, 1976b.
106. OUGH, C.S. Measurement of methylcarbamate formed by the addition of dimethyl dicarbonate to model solutions and to wines. **J. Agric. Food Chem.**, v.24, p.428-31, 1976c.
107. OUGH, C.S., LANGBEHN, L.L., STAFFORD, P.A. Influence of pH and ethanol on the effectiveness of dimethyl dicarbonate in controlling yeast growth in model wine systems. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.29, p.60-2, 1978.
108. PARK, D.L., RUA JR., S.M., ACKER, R.F. Direct application of a new hypochlorite sanitizer for reducing bacterial contamination on foods. **J. Food Prot.**, v.54, p.960-5, 1991.
109. PESSOA, G.V.A., SILVA, E.A.M. Meios de Rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.32, p.97-100, 1972.
110. PETERSON, T.W., OUGH, C.S. Dimethyldicarbonate reaction with higher alcohols. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.30, p.119-23, 1979.
111. PORTER, L.J., OUGH, C. S. The effects of ethanol, temperature and

dimethyldicarbonate on viability of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.33, p.222, 1982.

112. POUND, A.W. The initiation of skin tumours in mice by homologues and N-substituted derivatives of ethyl carbonate. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v.45, p.507-16, 1967.

113. RATHGEBER, B.M., WALDROUP, A.L. Antibacterial activity of a sodium acid pyrophosphate product in chiller water against selected bacteria on broiler carcasses. **J. Food Prot.**, v.58, p.530-4, 1995

114. RIET, W.B., PINCHES, S.G. Control of *Byssochlamys fulva* in fruit juices by means of intermittent treatment with dimethyldicarbonate. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.24, p.501-3, 1991.

115. RIET, W.B., BOTHA, A., PINCHES, S.E. The effect of dimethyldicarbonate on vegetative growth and ascospores of *Byssochlamys fulva* suspended in apple juice and strawberry nectar. **Int. J. Food Microbiol.**, v.8, p.95-102, 1989.

116. RISTIC, M., OSTHOLD, N. Effect of treatment with acid solutions on storage characteristics of broilers. **Mitt. Bundesanst. Fleischforsch.**, Kulmbach, n.86, p.6193-8, 1984.

117. ROBERTS, D. *Salmonella* in chilled and frozen chicken. **Lancet**, v.337, p.984-5, 1991.

118. ROSE, A.H. *Food microbiology*. London: Academic Press, 1983. p.102. (Economic Microbiology, v.8).

119. RUGAI, E., ARAUJO, A. Meio de cultura para identificação presuntiva de

bacilos intestinas Gram negativos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.28, p.79-83, 1968.

120. RUSSELL, S. M., FLETCHER, D. L., COX, N. A. A rapid method for the determination of temperature abuse of fresh broiler chicken. **Poult. Sci.**, v.71, p.1391-5, 1992.
121. RUSSELL, S. M., FLETCHER, D. L., COX, N. A. Spoilage bacteria of fresh broiler chicken carcasses. **Poult. Sci.**, v.75, p.2041-7, 1996.
122. RUSSELL, S. M., FLETCHER, D. L., COX, N. A. The effect of incubation temperature on recovery of mesophilic bacteria from broiler chicken carcasses subjected to temperature abuse. **Poult. Sci.**, v.73, p.1144-8, 1994.
123. SARANTOPOULOS, C.I.G.L., ALVES, R.M.V., GOMES, T.C. Embalagens com atmosfera modificada para aves. Rio de Janeiro: White Martins Gases Industriais, 1995. 43p. (Manual).
124. SAWAYA, W.N., ABU-RUWAIDA, A.S., HUSSAIN, A.J., KHALAFAWI, N.S., DASHTI, B.H. Shelf-life of vacuum-packaged eviscerated broiler carcasses under simulated market storage conditions. **J. Food Prot.**, v.13, p.305-21, 1993.
125. SHACKELFORD, A. D. Modifications of processing methods to control *Salmonella* in poultry. **Poult.Sci**, v.67, p.933-5, 1988.
126. SHARRATT, M., GAUNT, I.F., GRASSO, P., KISS, I.S., HOOSON, J., WRIGHT, M.G., GANGOLLI, S.D. Short-term toxicity studies on diethyl pyrocarbonate-treated beverages in the rat. **Food Cosmet. Toxicol.**, v.10, p.743-56, 1972.

127. SHELDON, B.W., BROWN, A.L. Efficacy of ozone as a disinfectant for poultry carcasses and chill water. **J. Food Sci.**, v.51, p.305-9, 1986.
128. SHIBASAKI, I., MATSUMOTO, K., HORIE, H. Preservation of foods with diethylpyrocarbonate. **J. Food Sci. Technol.**, v.16, p.410-3, 1969.
129. SILLIKER, J. H. The *Salmonella* problem: current status and future direction. **J. Food Prot.**, v.45, p.661-6, 1982.
130. SILLIKER, J. H., SCHMALL, A., CHIV, J.Y. The fluorescent antibody technique as a means of detecting *Salmonella* in foods. **J. Food Sci.**, v.31, p.240-4, 1966.
131. SILVA, J. A. Extensão da vida-de-prateleira da carne bovina pela utilização de sanitizantes físicos e químicos. Campinas,: 1995, 119p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
132. SILVA, J.C.T. *Análise do setor avícola brasileiro: elementos para planejamento estratégico*. s.n.t., 1996. 31p. (Apostila).
133. SILVA, M.A.A.P., DAMASIO, M.H. *Curso de análise sensorial descritiva*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, 1996.
134. SIMAL GANDARA, J., SIMAL LOZANO, J., PASEIRO LOSADA, P. Aproximacion a la toxicidad de los agentes conservantes de alimentos. **Alimentaria**, v.26, p.53-6, 1989.
135. SIMONSEN, B., BRYAN, F. L., CHRISTIAN, J. H. B., ROBERTS, T. A., TOMPKIN, R. B., SILLIKER, J. H. Prevention and control of food-borne

salmonellosis through application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP), **Int. J. Food Microbiol.**, v.4, p.227-47. 1987.

136. SMULDERS, F. J., BARENDSEN, P., LOGTESTTIN, J.G. van, MOSSEL, D.A.A., MAREL, G.M. van der Lactic acid, considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant. **J. Food Sci.**, Chicago, v.51, p.16-9, 1986.
137. SPLITTSTOESSER, D. F., WILKISON, M. Some factors affecting the activity of diethylpirocarbonate as a sterilant. **Appl. Microbiol.**, v.26, p.853-7, 1973.
138. SPLITTSTOESSER, D.F. Cold sterilization of fruit products. **New York's Food Life Sci.**, v.5, p.13-4, 1972.
139. TERRELL, F.R., MORRIS, J.R., JOHNSON, M.G., GBUR, E.E., MAKUS, D.J. Yeast inhibition in grape juice containing sulfur dioxide, sorbic acid, and dimethyldicarbonate. **J. Food Sci.**, v.58, p.1132-4, 1993.
140. THAYER, D. W, BOYD, G. Elimination of *E.coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.59, p.1030-4, 1993.
141. THAYER, D. W., DICKERSON, C.Y., RAO, D.R., BOYD, G., CHAWAN, C. Destruction of *Salmonella typhimurium* on chicken wings by gamma radiation. **J. Food Sci.**, v.57, p.586-9, 1992.
142. THOMAS, C. J., McMEEKIN, T. A. Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures: an electron microscopic study. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.40, p.133-44, 1980.
143. TODD, E. C. D. Poultry associate Foodborne disease: its occurrence, cost,

sources and prevention. **J. Food Prot.**, v.43, p.129-39, 1980.

144. TOMPKIN, R. B. The use of HACCP in the production of meat and poultry products. **J. Food Prot.**, v.53, p.795-803, 1990.
145. TSAI, H. C., SLAVIK, M. F. Rapid method for detection of *Salmonella* attached to chicken skin. **J. Food Saf.**, v.11, p.205-14, 1991.
146. UNITED STATES OF AMERICA. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. Intervention strategies for controlling pathogens in broiler processing. **J. Food Prot.**, v.57, p.1119, 1994.
147. VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of methods for the microbiological examination of food*. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219p.
148. WALDROUP, A. L. Summary of work to control pathogens in poultry processing. **Poult. Sci.**, v.72, p.1177-9, 1993.
149. WALDROUP, A. L., RATHGEBER, B. M., FORSYTHE, R. H., SMOOT, L. Effects of six modifications on the incidence and levels of spoilage and pathogenic organisms on commercially processed postchill broilers. **J. Appl. Poult. Res.**, v.1, p.226-34, 1992.
150. WALLHÄUSSER, K.H. Microbiological quality of water for pharmaceutical purposes. **Pharm. Ind.**, v.42, p.74-83, 1980.
151. XAVIER, C. V. A., BERAQUET, N. J. Vida-de-prateleria da carne de frango refrigerada: alternativas tecnológicas. II - Métodos de descontaminação. **Colet. Ital.** Campinas, v.24, p.121-8, 1994.

152. YANAGIDA, F. , SUMINOE, N.J. Acetic acid bacteria and their uses. III. Prevention of clouding of vinegar by diethylpyrocarbonate. **J. Soc. Brew.**, Japan, v. 67, p.61-5,1972.
153. ZEITOUN, A. A. M., DEBEVERE, J. M. Inhibition, survival and growth of *L. monocytogenes* on poultry as influenced by lactic acid treatment and modified atmosphere packaging. **Int. J. Food. Microbiol.**, v.14, p.161-70, 1991.
154. ZUTTER, L., SMEDT, J.M., ABRAMS, R., BECKERS, H., CATTEAU, M., BORCHGRAVE, J. Collaborative study on the use of motility enrichment on modified semisolid Pappaport-Vassiliadis medium for the detection of *Salmonella* from foods. **Int. J. Food Microbiol.**, v.13, p.11-20, 1991.

A N E X O S

Anexo A Avaliação Sensorial

Avaliação de peito de frango

Nome: _____ Data: _____

1. Tipo de odor:

- 0. Tempero
- 1. Normal
- 2. Carne guardada
- 3. Ranço
- 4. Velho
- 5. Fermentado
- 6. Pútrido
- 7. Outros

Amostra	Tipo de odor

2. Intensidade do odor:

- 1. Nenhum
- 2. Ligeiro
- 3. Moderado
- 4. Intenso
- 5. Extremamente intenso

Amostra	Intensidade de odor

3. Uniformidade da cor

- 1. Uniforme/normal
- 2. Ligeiramente desuniforme
- 3. Moderadamente desuniforme
- 4. Bastante desuniforme
- 5. Extremamente desuniforme

Amostra	Uniformidade

4. Cor da gordura:

- 1. Branco
- 2.
- 3. Amarelo
- 4.
- 5. Acinzentado

Amostra	Cor da gordura

5. Cor do músculo:

1. Amarelo
2. róseo amarelado
3. róseo
4. róseo pálido
5. Esbranquiçado
6. Cinza esbranquiçado
7. Outros

Amostra	Cor do músculo

6. O produto seria aceito pela cor, cite:

Amostra	Sim	Não	Comentários

7. Pelo odor você aceitaria o produto?

Amostra	Sim	Não	Comentários

XO B. Contagens de bactérias aeróbias mesófilas, obtidas experimentalmente nos pontos definidos pelo delineamento estatístico.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL			CONTAGEM DE BACTÉRIAS (UFC/g*)											
			Repetições											
			1			2			3			4		
Repetição	Tempo de imersão (segundos)	Tempo de estocagem (dias)	Inicial	Final	Inicial	Inicial	Final	Final	Inicial	Inicial	Final	Inicial	Final	Final
00	30	5	1,2 x 10 ³	3,4 x 10 ⁴	3,4 x 10 ²	5,5 x 10 ³	1,9 x 10 ³	3,1 x 10 ⁵	3,4 x 10 ²	1,7 x 10 ³	3,0 x 10 ⁵	1,7 x 10 ³	1,7 x 10 ³	3,0 x 10 ⁵
00	30	5	1,2 x 10 ³	1,5 x 10 ³	-	-	7,2 x 10 ²	1,2 x 10 ³	1,0 x 10 ³	1,1 x 10 ³	1,5 x 10 ³	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³	1,5 x 10 ³
00	60	5	7,4 x 10 ²	1,4 x 10 ³	1,0 x 10 ³	3,9 x 10 ³	1,2 x 10 ³	1,6 x 10 ⁶	7,2 x 10 ²	2,4 x 10 ³	7,2 x 10 ³	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³	7,2 x 10 ³
00	60	5	1,7 x 10 ³	3,5 x 10 ³	7,4 x 10 ²	1,1 x 10 ³	1,0 x 10 ³	3,9 x 10 ²	5,2 x 10 ³	7,5 x 10 ⁶	8,4 x 10 ²	1,2 x 10 ³	1,2 x 10 ³	8,4 x 10 ²
00	30	13	9,1 x 10 ²	1,7 x 10 ⁷	2,7 x 10 ³	1,5 x 10 ⁷	1,0 x 10 ³	7,3 x 10 ⁷	3,4 x 10 ²	2,3 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁷	1,9 x 10 ³	1,9 x 10 ³	1,9 x 10 ⁷
00	30	13	1,7 x 10 ³	1,1 x 10 ⁷	1,2 x 10 ³	9,0 x 10 ⁶	9,8 x 10 ²	4,3 x 10 ⁶	1,0 x 10 ³	1,7 x 10 ⁶	2,4 x 10 ⁶	7,4 x 10 ²	7,4 x 10 ²	2,4 x 10 ⁶
00	60	13	7,2 x 10 ²	1,5 x 10 ⁷	6,1 x 10 ²	2,9 x 10 ⁷	1,5 x 10 ³	2,4 x 10 ⁷	7,4 x 10 ²	4,7 x 10 ⁷	1,9 x 10 ⁷	5,2 x 10 ³	5,2 x 10 ³	1,9 x 10 ⁷
00	60	13	5,6 x 10 ³	1,4 x 10 ⁷	1,7 x 10 ³	8,2 x 10 ⁶	1,2 x 10 ³	9,2 x 10 ⁶	9,1 x 10 ²	1,8 x 10 ⁷	1,8 x 10 ⁷	1,7 x 10 ³	1,7 x 10 ³	1,8 x 10 ⁷
00	45	9	3,4 x 10 ²	1,3 x 10 ⁷	9,8 x 10 ²	8,1 x 10 ⁶	2,7 x 10 ³	1,5 x 10 ⁷	1,5 x 10 ³	7,6 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁷	1,2 x 10 ³	1,2 x 10 ³	1,4 x 10 ⁷
00	45	9	-	-	1,2 x 10 ³	3,6 x 10 ⁵	1,7 x 10 ³	1,9 x 10 ⁵	7,2 x 10 ²	6,3 x 10 ⁵	8,8 x 10 ⁵	1,6 x 10 ³	1,6 x 10 ³	8,8 x 10 ⁵
00	15	9	9,8 x 10 ²	9,0 x 10 ⁵	2,7 x 10 ³	1,6 x 10 ⁵	1,2 x 10 ³	2,2 x 10 ⁶	1,2 x 10 ³	9,6 x 10 ⁵	7,1 x 10 ⁵	9,1 x 10 ²	9,1 x 10 ²	7,1 x 10 ⁵
00	75	9	5,6 x 10 ³	1,2 x 10 ⁵	6,1 x 10 ²	1,9 x 10 ⁴	1,6 x 10 ³	4,4 x 10 ⁷	2,7 x 10 ³	2,7 x 10 ⁷	5,8 x 10 ⁴	7,2 x 10 ²	7,2 x 10 ²	5,8 x 10 ⁴
00	45	1	-	-	1,6 x 10 ³	6,4 x 10 ²	5,6 x 10 ³	2,0 x 10 ³	1,7 x 10 ³	3,7 x 10 ²	6,5 x 10 ³	5,6 x 10 ³	5,6 x 10 ³	6,5 x 10 ³
00	45	17	1,9 x 10 ³	8,7 x 10 ⁶	1,2 x 10 ³	2,1 x 10 ⁷	5,2 x 10 ³	2,3 x 10 ⁷	1,0 x 10 ³	9,4 x 10 ⁷	8,6 x 10 ⁷	7,4 x 10 ²	7,4 x 10 ²	8,6 x 10 ⁷
00	45	9	9,1 x 10 ²	6,1 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³	9,1 x 10 ⁴	6,1 x 10 ²	9,8 x 10 ⁴	1,5 x 10 ³	9,6 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁵	5,6 x 10 ³	5,6 x 10 ³	2,7 x 10 ⁵
00	45	9	1,7 x 10 ³	5,5 x 10 ⁵	1,2 x 10 ³	2,3 x 10 ⁴	1,6 x 10 ³	5,6 x 10 ⁵	5,2 x 10 ³	8,6 x 10 ⁵	2,6 x 10 ⁶	6,1 x 10 ²	6,1 x 10 ²	2,6 x 10 ⁶
00	45	9	1,0 x 10 ³	6,3 x 10 ⁸	9,8 x 10 ²	1,6 x 10 ⁴	1,5 x 10 ³	9,1 x 10 ⁴	3,4 x 10 ²	7,8 x 10 ⁵	-	-	-	-

3 - unidades formadoras de colônia por grama

ANEXO C. Valores médios e desvio padrão para os atributos avaliados na análise sensorial de peito de frango submetido a tratamento com 4.500 ppm de DMDC.

AMOSTRA	Tempo de estocagem	Tipo de odor ¹	Intensidade de odor	Aceitação de odor	Cor da gordura	Cor do músculo	Uniformidade da cor do músculo
C	2	0,75±0,45	2,42±0,67	1,00±0,00	2,92±0,29	2,67±0,51	1,33±0,49
C	4	1,00±0,00	2,08±0,51	1,00±0,00	2,83±1,83	2,00±0,49	1,83±0,39
C	5	2,00±1,41	2,54±0,66	1,25±0,45	2,42±0,63	2,50±0,65	1,58±0,42
C	8	5,33±1,15	3,33±0,75	1,67±0,49	2,42±0,51	2,58±0,60	1,92±0,29
C	10	5,75±0,40	3,50±1,09	1,92±0,29	2,67±0,49	3,21±0,78	1,92±0,51
T	2	0,33±0,49	2,67±0,49	1,00±0,00	2,67±0,49	2,25±0,83	1,42±0,51
T	4	1,00±0,00	2,25±0,97	1,00±0,00	2,75±0,43	1,92±0,60	1,83±0,39
T	5	2,17±2,44	2,33±0,49	1,00±0,00	2,25±0,58	2,58±0,45	1,79±0,45
T	8	5,67±0,78	3,08±0,79	1,83±0,39	2,50±0,50	2,25±0,29	2,08±0,29
T	10	4,67±1,30	2,42±0,67	1,75±0,45	2,58±0,49	2,79±0,30	2,00±0,60

¹ - média e desvio-padrão

ANEXO D. Valores médios e desvio padrão das avaliações de pH e cor pelo sistema CIE L.* a.* b.*, realizadas em peito de frango submetido a tratamento com 4.500 ppm de DMDC.

AMOSTRA	Tempo de estocagem	Valores de L*	Valores de a*	Valores de b*	pH da superfície	
					músculo	pele
C	2	46,82±1,12	0,53±0,45	6,27±0,86	5,56±0,30	5,69±0,31
C	4	46,03±1,56	1,57±0,47	6,67±1,20	5,84±0,11	5,77±0,09
C	5	44,53±1,53	0,80±0,58	6,08±1,30	5,82±0,07	5,82±0,09
C	8	44,65±1,10	1,40±0,35	6,28±0,96	6,14±0,14	6,09±0,11
C	10	50,83±9,16	1,05±0,64	7,68±3,44	6,01±0,03	6,12±0,13
T	2	48,08±2,69	0,77±0,75	6,85±1,23	5,82±0,12	5,85±0,07
T	4	46,03±1,95	1,48±0,32	6,83±1,00	5,84±0,10	5,74±0,10
T	5	45,10±2,66	0,32±0,33	6,35±1,11	5,80±0,08	5,73±0,14
T	8	45,85±1,31	1,43±1,11	6,70±1,16	6,09±0,17	6,05±0,13
T	10	46,88±1,45	1,33±0,82	6,65±1,17	5,95±0,06	6,05±0,08