

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CARÇAÇAS DE FRANGO E
ÁGUA EM UM SISTEMA DE PRÉ-RESFRIAMENTO POR
IMERSÃO EM 8 HORAS E 16 HORAS

LUIZ CARLOS TEIXEIRA DE SOUZA JÚNIOR

BOTUCATU – SP
Dezembro de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CARÇAÇAS DE FRANGO E
ÁGUA EM UM SISTEMA DE PRÉ-RESFRIAMENTO POR
IMERSÃO EM 8 HORAS E 16 HORAS

LUIZ CARLOS TEIXEIRA DE SOUZA JÚNIOR

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes de
Almeida Nogueira Pinto

BOTUCATU – SP
Dezembro de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Souza Júnior, Luiz Carlos Teixeira.

Avaliação microbiológica de carcaças de frango e água em um sistema de pré-resfriamento por imersão em 8 horas e 16 horas / Luiz Carlos Teixeira de Souza Júnior. – Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Assunto CAPES: 50505009

1. Frango de corte - Inspeção 2. Carcaças - Contaminação

CDD 664.9

Palavras-chave: Abate de aves; Pré-resfriamento; Qualidade microbiológica

Nome do Autor: Luiz Carlos Teixeira de Souza Júnior

Título: Avaliação microbiológica de carcaças de frango e água em um sistema de pré-resfriamento por imersão em 8 horas e 16 horas

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu
Orientador

Prof. Dr. Germano Francisco Biondi
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu
Membro

Prof. Dr. Vera Lúcia Mores Rall
Instituto de Biociências - UNESP - Botucatu
Membro

Data da defesa: 17/12/2009

DEDICATÓRIA

Aos amigos Anee Valéria Mendonça Stachissini, Jean Guilherme Fernandes Joaquim, Ricardo Seiti Yamatogi e Thiago Braga Izidoro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos professores José Paes de Almeida Nogueira Pinto, Vera Lúcia Mores Rall, Germano Francisco Biondi e Thiago Braga Izidoro pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Aos amigos de Botucatu: Anee Valéria Mendonça Stachissini, Denise Aparecida Fioravanti Garcia, Gilda Pinto do Amaral, Gustavo Puglia Machado, Jean Guilherme Fernandes Joaquim, José Roberto de Lalla Júnior, Júlia Arantes Galvão, Juliano Gonçalves Pereira, Karina Basso Santiago, Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel, Ricardo Seiti Yamatogi, Sílvia Helena Gotardi e Thiago Luiz Belém Spina.

Aos colegas e amigos do MAPA: Adriana Cássia de Oliveira, Elenita Ruttscheidt Albuquerque, Esequiel Liuson, Fábio de Oliveira Sandon, Leandro d'Arc Moretti, Leonardo Werlang Isolan, Montemar Shoussuke Onishi, Ricardo Ichiro Sakate, Teresa Cristina Lopes Fernandes Garcia e Valéria Stacchini Ferreira Homem.

À minha família, minha eterna motivação...

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Resultados de análises de água tratada (abastecimento do <i>chiller</i>)	43
QUADRO 2	Resultados de análises de água do <i>chiller</i>	44
QUADRO 3	Resultados de contagem de aeróbios mesófilos em carcaças.....	45
QUADRO 4	Resultados de contagem de Enterobacteriaceae em carcaças.....	46
QUADRO 5	Resultados de contagem de coliformes a 35°C em carcaças.....	47
QUADRO 6	Resultados de contagem de <i>E. coli</i> em carcaças	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Média e desvio padrão das contagens de aeróbios mesófilos (\log_{10} UFC/mL), de coliformes a 35°C (NMP/mL) e de <i>E. coli</i> (NMP/mL) da água do <i>chiller</i> segundo tempo de processamento 21
TABELA 2	Média e desvio padrão das contagens de aeróbios mesófilos (\log_{10} UFC/g), de Enterobacteriaceae (\log_{10} UFC/g), de coliformes a 35°C (\log_{10} UFC/g) e de <i>E. coli</i> (\log_{10} UFC/g) em carcaças segundo tempo de processamento e ponto de colheita das amostras 22

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Tanque de pré-resfriamento por imersão em água (*chiller*)5
- FIGURA 2** Esvaziamento e higienização de um *chiller*.8

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O abate de aves no Brasil	3
2.2 Pré-resfriamento de carcaças e resfriamento de produtos de aves	6
2.2.1 O pré-resfriamento de carcaças de aves no Brasil	7
2.2.2 O pré-resfriamento de carcaças de aves por imersão na União Europeia.....	9
2.2.3 O resfriamento comercial de carne de frango	10
2.3 Indicadores microbiológicos	11
2.3.1 Contagem total de aeróbios mesófilos	11
2.3.2 Contagem de Enterobacteriaceae.....	12
2.3.3 Contagens de coliformes a 35 °C e de <i>Escherichia coli</i>	13
3 OBJETIVOS	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Procedimentos de colheita de amostras de água:	15
4.1.1 Água tratada:.....	15
4.1.2 Água do <i>chiller</i> :	16
4.2 Análises físico-químicas de água:.....	16
4.2.1 Temperatura:.....	16
4.2.2 Concentração de cloro residual livre:	16
4.2.3 pH.....	16
4.3 Análises microbiológicas de água:	16
4.3.1 Contagem de aeróbios mesófilos.....	16

4.3.1.1	Água tratada.....	16
4.3.1.2	Água do <i>chiller</i>	16
4.3.2	Contagem de coliformes a 35 °C/ <i>E. coli</i>	17
4.3.2.1	Água tratada.....	17
4.3.2.2	Água do <i>chiller</i>	17
4.4	Procedimentos de colheita de carcaças:.....	17
4.4.1	Carcaças antes do pré-resfriamento	17
4.4.2	Carcaças após o pré-resfriamento	18
4.5	Análises microbiológicas de carcaças de frango.....	18
4.5.1	Preparo da amostra.....	18
4.5.2	Contagem de aeróbios mesófilos.....	18
4.5.3	Contagem de coliformes a 35 °C/ <i>E. coli</i>	18
4.5.4	Contagem de Enterobacteriaceae.....	19
4.6	Cálculo de renovação contínua de água	19
4.7	Procedimento estatístico	20
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1	Considerações gerais	21
5.2	Avaliação microbiológica da água residente do <i>chiller</i>	21
5.3	Avaliação microbiológica das carcaças de frango.....	22
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	28
7	CONCLUSÕES.....	29
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
9	TRABALHO CIENTÍFICO.....	33
9.1	Normas para publicação da revista.....	33
10.	ANEXOS.....	43

SOUZA JÚNIOR, L.C.T. **Avaliação microbiológica de carcaças de frango e água em um sistema de pré-resfriamento por imersão em 8 horas e 16 horas**. Botucatu, 2009, 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

RESUMO

Desde 2004 o Brasil é o líder nas exportações de carne de frango. Dada a importância deste setor na economia brasileira, é fundamental garantir a inocuidade desse alimento, através do controle e monitoramento das etapas de produção suscetíveis à contaminação, como o pré-resfriamento. O presente trabalho objetivou avaliar as alterações da carga microbiana nas carcaças de frango e na água residente do *chiller* em um sistema de pré-resfriamento por imersão em água após 8 horas e 16 horas de processamento industrial, e embasar discussão sobre a determinação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de esvaziamento completo, limpeza e desinfecção de cada tanque desse sistema ao final de cada 8 horas. Foram colhidas para as análises, carcaças antes e após o pré-resfriamento (mesófilos, Enterobacteriaceae, coliformes a 35°C e *E. coli*), além de amostras de água tratada usada no abastecimento do sistema e de água residente do *chiller* (mesófilos, coliformes a 35°C e *E. coli*). Foram colhidas amostras (carcaças e água) ao final de 8 horas e de 16 horas de trabalho. Os resultados obtidos não justificam a determinação de se esvaziar o *chiller* após 8 horas, podendo esse período ser prolongado para 16 horas, já que todas as análises microbiológicas, tanto das carcaças quanto da água, mostraram não haver diferença estatística significativa nas contagens dos indicadores microbiológicos avaliados. Tais dados conferem um suporte técnico-científico para discussão sobre alteração da legislação federal no tocante à etapa de pré-resfriamento por imersão de carcaças de frangos em água.

Palavras-chave: abate de aves, pré-resfriamento, qualidade microbiológica.

SOUZA JÚNIOR, L.C.T. **Study of microbiological effects of the use of water-chilling of poultry carcasses 16 hours after complete emptying, cleaning and disinfection.** Botucatu, 2009, 50p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

ABSTRACT

Since 2004 Brazil remains the leading exporter of chicken meat. Due to the importance of this sector in the Brazilian economy, it is essential to ensure the food safety produced by controlling and monitoring the production stages susceptible to contamination, such as the chilling. This study aimed to evaluate changes in microbial load on chicken carcasses and chilling water residing in immersion chilling system in water after 8 and 16 hours of industrial processing. It is also an objective to underlie the discussion on the Brazilian Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply normative that determines complete empty, clean and disinfection of each tank of the system at the end of every 8 hours. Prechill and postchill carcasses were obtained and analyzed for mesophiles, Enterobacteriaceae, coliforms at 35°C and *Escherichia coli*. Samples of clean water consumed in the system and the chiller water were also taken and analyzed for mesophiles, coliforms at 35°C and *E. coli*. The results obtained do not justify a determination to empty the tank after 8 hours and thus this period could be extended to 16 hours, as all microbiological testing of both the water and the carcasses showed no statistically significant difference in scores of microbiological indicators evaluated. These data give a technical and scientific support for discussion of change in federal law regarding the management of the water in a immersion chilling system during poultry slaughter.

Key words: poultry slaughter, immersion chilling, microbiology quality.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil manteve a posição de maior exportador mundial de carne de frango em 2008, com participação superior a 40% nas vendas no mercado internacional, de acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF). Os embarques para exportação encerraram 2008 com 3,6 milhões de toneladas, um recorde na história do setor (ABEF, 2009).

O Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tradicionalmente optou por um modelo de inspeção sanitária baseado no controle de processo. Esse procedimento fundamenta-se na inspeção contínua e sistemática de todos os fatores que podem interferir na qualidade higiênico-sanitária dos produtos consumidos pela população (BRASIL, 2005).

De forma complementar às atividades rotineiras de inspeção e acompanhando os avanços das legislações no tocante às responsabilidades dos fabricantes, o DIPOA inseriu nas suas tarefas rotineiras a avaliação da implantação e da execução, por parte das indústrias, dos chamados programas de autocontrole (BRASIL, 2005).

Os estabelecimentos são obrigados a desenvolver, a implantar e a monitorar os programas de autocontrole porque são responsáveis pela qualidade de seus produtos e devem demonstrar, através de evidências, que os produtos oferecidos aos consumidores são inócuos.

Em matadouro de aves, ficou estabelecida especificamente a avaliação da qualidade microbiológica do sistema de pré-resfriamento através de análises de carcaças colhidas antes e após a passagem pelo sistema (BRASIL, 2007).

No entanto, desde 1998, os matadouros de aves que utilizam o método de pré-resfriamento por imersão em água, devem esvaziar completamente, limpar e desinfetar cada tanque do sistema no final de cada período de 8 horas de trabalho ou quando necessário, a juízo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 1998).

Há discussão sobre essa determinação do MAPA, pela hipótese de que a renovação constante de água durante o processamento industrial, associada ao controle de alguns de seus parâmetros, como temperatura e cloração, seria suficiente para garantir os padrões microbiológicos da água e das carcaças.

Os problemas com o pré-resfriamento por imersão incluem o uso de grandes quantidades de água potável, o custo do tratamento dos efluentes e o possível aumento do risco de contaminação cruzada (SMITH et al., 2005).

Isolan (2007) concluiu que há a possibilidade de garantir a eficácia do sistema de pré-resfriamento por imersão de carcaças em água, mesmo após 8 horas de abate, sem necessidade de esvaziamento e higienização do tanque, porém, sugeriu mais estudos para observação do comportamento das contagens microbiológicas da água e das carcaças após um ciclo de 8 horas de trabalho.

Não há, na literatura consultada, qualquer relato de avaliação de carcaças de frango ou de água do *chiller* em sistema de pré-resfriamento por imersão que tenha funcionado por período superior a 8 horas de trabalho sem ter sido esvaziado e higienizado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O abate de aves no Brasil

Nos matadouros, as aves são recepcionadas em uma plataforma coberta, devidamente protegida dos ventos e da incidência direta de raios solares. Quando não é possível o abate imediato, permite-se a espera em local específico com cobertura, ventilação e umidificação do ambiente (BRASIL, 1998).

A insensibilização deve ser realizada preferencialmente por eletronarcore sob imersão em líquido e não deve promover, em nenhuma hipótese, a morte das aves. A operação de sangria deve ser iniciada no prazo máximo de doze segundos após a insensibilização da ave e ser efetuada com os animais contidos pelos pés, em ganchos de material inoxidável, apoiados em trilhagem aérea mecanizada (BRASIL, 1998).

Na sangria automatizada, é necessária a supervisão de um operador, visando realizar manualmente o processo em caso de falha do equipamento, impedindo que o animal alcance a escaldagem sem a devida morte pela sangria (BRASIL, 2000). A partir da sangria, todas as operações devem ser realizadas continuamente, não sendo permitido o retardamento ou acúmulo de aves em nenhuma de suas fases até a entrada das carcaças nas câmaras frigoríficas (BRASIL, 1998).

A escaldagem e a depenagem devem ser realizadas em instalações próprias e/ou comuns às duas atividades, completamente separadas através de paredes das demais áreas operacionais. Antes da evisceração, as carcaças devem ser lavadas em chuveiros de aspersão dotados de água sob pressão, com jatos orientados no sentido de que toda ela seja lavada, inclusive os pés (BRASIL, 1998).

Os trabalhos de evisceração compreendem desde a operação de corte da pele do pescoço até a *toilette* final das carcaças. As operações devem obedecer aos cuidados necessários para evitar o rompimento de vísceras e o contato das carcaças com superfícies contaminadas. Na seção de evisceração, podem ser efetuados também o pré-resfriamento, o gotejamento, a embalagem

primária e a classificação, desde que não haja prejuízo higiênico de nenhuma operação (BRASIL, 1998).

Na calha de evisceração, são executados o corte da pele do pescoço e traqueia, a extração de cloaca, a abertura do abdômen, a exposição das vísceras (eventração), a inspeção *post-mortem*, a retirada das vísceras, a extração dos pulmões, a *toilette* e a lavagem das superfícies internas e externas das carcaças. Quando tratar-se de pré-resfriamento por imersão em água, a localização do equipamento para lavagem por aspersão das carcaças deve estar localizado logo após a evisceração e imediatamente anterior ao sistema de pré-resfriamento, não sendo permitido qualquer manipulação das carcaças após o procedimento de lavagem (BRASIL, 1998).

O pré-resfriamento pode ser efetuado através de aspersão de água gelada, imersão em água por resfriadores contínuos tipo rosca sem fim (Figura 1), resfriamento por ar ou outro processo, desde que aprovado pelo DIPOA. A temperatura da água residente, medida nos pontos de entrada e de saída das carcaças do sistema de pré-resfriamento por imersão, não deve ser superior a 16 °C e 4 °C, respectivamente, no primeiro e último estágio. Deve-se observar o tempo máximo de permanência das carcaças no primeiro estágio, de trinta minutos, e a temperatura das carcaças no final do processo de pré-resfriamento igual ou inferior a 7 °C. Toleram-se a temperatura de 10 °C desde que as carcaças sejam destinadas ao congelamento imediato (BRASIL, 1998).



FIGURA 1. Tanque de pré-resfriamento por imersão em água (*chiller*).

A absorção da água nas carcaças de aves submetidas ao pré-resfriamento por imersão não deve ultrapassar 8% de seus pesos. A retirada da água excedente pode ser realizada por gotejamento ou por processos tecnológicos diferenciados (BRASIL, 1998).

A classificação final pode ser efetuada antes ou após a embalagem. Uma vez embaladas primariamente, o acondicionamento de carcaças em embalagens secundárias é feito em continentes novos e de primeiro uso. Essa operação deve ser realizada em local específico e independente de outras seções. As carcaças devem, de preferência, passar da seção de embalagem para a antecâmara através de óculo provido de “cortina de ar”, evitando-se a perda desnecessária de frio e a circulação desnecessária de carrinhos e continentes entre essas seções (BRASIL, 1998).

Os cortes podem ser efetuados na seção de embalagem primária e classificação desde que esta seja climatizada, com temperatura ambiente não superior a 12°C, isolada das demais seções e de maneira que não interfira com o fluxo operacional de embalagem e classificação (BRASIL, 1998).

As antecâmaras devem ser climatizadas e servir apenas como área de circulação. A área frigorífica deve ser constituída por antecâmara(s),

instalação(ões) de resfriamento e/ou congelamento rápido e câmara(s) de estocagem, proporcionais à capacidade de abate e produção. As carcaças de aves resfriadas devem apresentar temperatura entre -1 °C (um grau negativo) e 4 °C, tolerando-se variação máxima de 1 °C. As carcaças congeladas, -12 °C, com tolerância máxima de temperatura 2 °C superior (BRASIL, 1998).

Os veículos empregados no transporte de carne de aves devem ser dotados de unidade de refrigeração, tolerando-se carroceria isotérmica somente para transporte de curta duração, que não permita a elevação da temperatura dos produtos em mais de 2 °C (BRASIL, 1998).

Pela legislação vigente no Brasil e conceitos internacionalmente aceitos, não se espera ausência de *Salmonella* spp. em produtos crus de aves (BRASIL, 2008). O aumento das garantias de inocuidade dos produtos avícolas no mercado interno e externo é um dos objetivos do Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus (Instrução Normativa N° 70 da SDA do MAPA, de 06/10/2003), que implementou a análise laboratorial sistemática e contínua de carcaças de frangos e perus *in natura* para pesquisa de *Salmonella*, envolvendo todos os estabelecimentos de abate registrados no DIPOA (BRASIL, 2003b).

2.2 Pré-resfriamento de carcaças e resfriamento de produtos de aves

Pré-resfriamento é o processo de rebaixamento da temperatura das carcaças de aves, imediatamente após as etapas de evisceração e lavagem, para valores iguais ou inferiores a 7 °C. Resfriamento é o processo de refrigeração e manutenção da temperatura dos produtos de aves (carcaças, cortes ou recortes, miúdos e/ou derivados) entre 0 °C (zero grau centígrado) e 4 °C, medida na intimidade dos mesmos, com tolerância de 1 °C (BRASIL, 1998).

O pré-resfriamento de carcaças de frango é realizado através da redução da temperatura da carne a um ponto em que a taxa de multiplicação de microrganismos deteriorantes é reduzida e a de multiplicação da maioria dos

patógenos é prevenida. Além disso, o pré-resfriamento reduz a ocorrência de microrganismos patógenos e deteriorantes em carcaças de frango (JAMES et al., 2006).

2.2.1 O pré-resfriamento de carcaças de aves no Brasil

No Brasil, o pré-resfriamento é efetuado principalmente através de imersão em água, que consiste em mover continuamente as carcaças por meios mecânicos, em resfriadores contínuos tipo rosca sem fim, através de um fluxo de água contracorrente.

De acordo com o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves (Portaria N° 210 da SDA do MAPA, de 10/11/1998), a água de renovação do sistema pode ser hiperclorada, permitindo-se no máximo 5 mg/L de cloro residual livre. O seu reaproveitamento nos resfriadores pode ser permitido desde que venha a apresentar novamente os padrões de potabilidade exigidos após tratamento adequado. Quando empregada a injeção de ar nesses tanques de pré-resfriamento por imersão para movimentação de água (borbulhamento), esse ar deve ser previamente filtrado (BRASIL, 1998).

A renovação de água ou água gelada dos resfriadores contínuos, durante os trabalhos, deve ser constante e em sentido contrário à movimentação das carcaças (contracorrente), sendo que a renovação de água no último tanque não deve ser inferior a 1,0 L por carcaça com peso não superior a 2,5 kg; 1,5 L por carcaça com peso entre 2,5 e 5,0 kg e 2 L por carcaça com peso superior a 5 kg. A água utilizada para encher os tanques pela primeira vez não deve ser incluída no cálculo dessas quantidades, mas o gelo adicionado ao sistema deve ser considerado (BRASIL, 1998).

O sistema de pré-resfriamento em resfriadores contínuos por imersão deve dispor de equipamentos de mensuração que permitam o controle e registro constante da temperatura da água dos tanques e do volume de água renovada nos estágios do sistema (hidrômetro ou similar). Cada tanque do sistema deve ser completamente esvaziado, limpo e desinfetado (Figura 2) no

final de cada período de trabalho (8 horas), ou quando se fizer necessário, a juízo do SIF (BRASIL, 1998).



FIGURA 2. Esvaziamento e higienização de um *chiller*.

Em 2007, a Divisão de Inspeção de Carne de Aves e Ovos (DICA) do DIPOA estabeleceu que, para a avaliação da qualidade microbiológica do sistema de pré-resfriamento, e comprovação de que o estabelecimento não usa outros descontaminantes que não o cloro, devem ser analisadas carcaças antes e após o pré-resfriamento. A amostra deve ser composta de 5 carcaças de aves colhidas antes e 5 após a passagem pelo sistema e a frequência dessas análises é de uma vez por mês para cada linha (ou seja, se houver duas linhas, são duas colheitas, não sendo necessariamente no mesmo dia). A avaliação dos resultados deve ser feita na forma de tendência demonstrada pelo estabelecimento. Tendência a redução de mais de 2 log ou de aumento de log são consideradas não conformes (BRASIL, 2007).

2.2.2 O pré-resfriamento de carcaças de aves por imersão na União Europeia

Nos Estados-membros da União Europeia (UE), as carcaças submetidas ao pré-resfriamento por imersão devem passar por um ou mais tanques de água ou de gelo e água, cujo conteúdo deve ser continuamente renovado. Como no Brasil, a temperatura da água do fluxo ou dos tanques, medida nos pontos de entrada e saída das carcaças, também não deve ser superior a 16°C e 4°C, respectivamente (CEE, 1992).

De acordo com a Diretiva 92/116/CEE da UE, se existirem diversos tanques, a renovação de água em cada um deles deve ser regulada de modo a diminuir progressivamente no sentido do movimento das carcaças, sendo a água dividida entre os tanques de modo a que a corrente no último tanque não seja inferior a 1 L por carcaça com peso igual ou inferior a 2,5 kg, 1,5 L por carcaça com peso compreendido entre 2,5 e 5 kg, e 2 L por carcaça com peso igual ou superior a 5 kg (a água utilizada para encher os tanques pela primeira vez também não é incluída no cálculo destas quantidades). As carcaças não devem permanecer no primeiro tanque mais de trinta minutos (CEE, 1992).

Deve haver um controle adequado e contínuo da medição e do registro do consumo de água durante a lavagem por aspersão antes da imersão, da temperatura da água no tanque ou tanques, nos pontos de entrada e saída das carcaças, do consumo de água durante a imersão e do número de carcaças de cada uma das categorias de peso previstas na Diretiva 92/116/CEE (CEE, 1992).

O funcionamento correto da instalação de pré-resfriamento e os seus efeitos na higiene devem ser avaliados por métodos microbiológicos, sendo a contaminação das carcaças determinada por comparação do número total de microrganismos e de enterobactérias antes e depois da imersão. Esta comparação deve ser efetuada quando as instalações forem utilizadas pela primeira vez e, em seguida, periodicamente, devendo-se, de qualquer modo, efetuar um controle sempre que se proceder a qualquer alteração das instalações (CEE, 1992).

Nos Estados-membros da UE, assim como no Brasil, cada parte do dispositivo deve ser completamente esvaziada, limpa e desinfetada, sempre que necessário, no final de cada período de 8 horas e, pelo menos, uma vez por dia (CEE, 1992).

2.2.3 O resfriamento comercial de carne de frango

O resfriamento da carne de frango é um dos fatores mais importantes para a manutenção de sua qualidade, tanto para o consumo quanto para o processamento. Depois do abate e do processamento, ocorrem alterações bioquímicas, físicas e histológicas devido à influência de constituintes da carne ou de microrganismos, sendo a temperatura um fator importante que afeta essas mudanças. Quanto mais baixas as temperaturas e mais rápido o resfriamento for efetuado, mais lentamente as mudanças ocorrem e menos acentuada é a perda de suas características iniciais (PETRAK et al., 1999).

Cason et al. (2004) testaram se a contaminação fecal da pele de frangos, durante o processamento poderia ser detectada pelo aumento das contagens em amostras colhidas antes e depois do pré-resfriamento por imersão. Após o pré-resfriamento, as contagens de bactérias nas metades de carcaças contaminadas por fezes não foram diferentes das contagens nas metades não-contaminadas. Não foram encontradas, portanto, evidências de que os números de enterobactérias, de coliformes a 35°C e de *E. coli* em amostras colhidas após o pré-resfriamento são influenciadas por contaminação fecal das carcaças anterior ao pré-resfriamento.

Smith et al. (2005) investigaram se o resfriamento por imersão, isolado de outros fatores que sabidamente diminuem os números ou a incidência de bactérias (lavagem das carcaças antes do resfriamento, renovação de água dos tanques/fluxo contínuo de água contracorrente, adição de cloro), afeta a microbiologia de metades de carcaças de frango submetidas tanto a contaminação direta quanto a contaminação cruzada por fezes. Nem a contaminação direta nem a contaminação cruzada tiveram qualquer efeito significativo nos números de coliformes a 35°C ou *E. coli* comparados com os

controles, o que indicou que o resfriamento por imersão é eficaz na redução dos números de bactérias nas carcaças a um nível que parece constante.

Northcutt et al. (2006) investigaram o impacto bacteriológico do uso de diferentes volumes de água, durante o resfriamento de carcaças de frango por imersão. O resfriamento por imersão, tanto com o uso de pequeno volume quanto de grande volume de água, reduziu as contagens de aeróbios mesófilos, de enterobactérias, de *E. coli* e de *Campylobacter*. No entanto, os pesquisadores concluíram que uma pequena redução bacteriológica promovida pelo aumento do volume de água pode não ser suficiente para compensar os custos econômicos.

Quando é usado o sistema de pré-resfriamento por imersão, são intensificadas as reduções nas contagens de microrganismos, especialmente se a água é clorada (JAMES et al., 2006). O fluxo de água e a propulsão de carcaças de frango na direção oposta a ele tornam o tanque de resfriamento (*chiller*) um ecossistema em condições de causar um grande estresse às células bacterianas, reduzindo a carga microbiana (VOIDEROU et al., 2007).

2.3 Indicadores microbiológicos

2.3.1 Contagem total de aeróbios mesófilos

A contagem total de aeróbios mesófilos em placas, também denominada contagem padrão em placas ou contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis (BRASIL, 2003a) é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Não diferencia tipos de bactéria, sendo utilizada para se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira (SILVA, 2007).

Não é um indicador de inocuidade, pois não está diretamente relacionado à presença de patógenos ou toxinas. Dependendo da situação, pode ser útil na avaliação da qualidade, porque contagens elevadas de bactérias podem indicar

deficiências na higienização ou falha no controle do processo ou dos ingredientes (SILVA, 2007).

O método clássico de contagem total de mesófilos em alimentos é a contagem padrão em placas (plaqueamento em profundidade, superfície ou filtração em membrana). O meio de cultivo recomendado para a maioria dos ensaios é o Ágar Padrão para Contagem (PCA), incubado a $35\pm 1^\circ\text{C}/48\pm 2$ h (SILVA, 2007).

2.3.2 Contagem de Enterobacteriaceae

Os membros da família Enterobacteriaceae são comumente chamados de enterobactérias e incluem bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos (exceto o gênero *Plesiomonas*, recentemente transferido para essa família). São quimiorganotróficas com metabolismo respiratório e fermentativo, a maioria produzindo ácidos e gás na fermentação da glicose e outros carboidratos. Não são halofílicas, produzem catalase (exceto *Xenorhabdus* e algumas cepas de *Shigella dysenteriae*) e reduzem nitrato a nitrito (exceto *Saccharobacter fermentatus* e algumas cepas de *Erwinia* e *Yersinia*) (BRENNER, 2005).

Escherichia é um dos gêneros dessa família, que inclui diversos outros gêneros de importância em alimentos, como *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia*. Na família também se encontram as bactérias dos grupos coliformes totais (ou coliformes a 35°C) e coliformes termotolerantes (coliformes fecais ou coliformes a 45°C) (BRENNER, 2005).

As enterobactérias estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água, plantas, frutas, vegetais, carnes, ovos, grãos, animais, insetos e no homem. Várias enterobactérias são também patogênicas para o homem, representando risco para a saúde pública em todo o mundo. *Salmonella* é a mais importante, sendo as aves, os ovos, os ovinos e os suínos os principais veículos para humanos (BRENNER, 2005).

As enterobactérias são utilizadas como indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativadas pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha (BRENNER, 2005).

A quantificação de enterobactérias pode ser feita pelo método de contagem padrão em placas, utilizando o Ágar Vermelho Violeta Bile Glicose (VRBG) como meio de cultivo, pela técnica do Número Mais Provável (NMP) e pelo método do Petrifilm *Enterobacteriaceae* da 3M Company (SILVA, 2007).

2.3.3 Contagens de coliformes a 35°C e de *Escherichia coli*

O grupo dos coliformes a 35°C é um subgrupo da família Enterobacteriaceae em que estão apenas as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Mais de 20 espécies se encaixam nessa definição, dentre as quais se encontrando tanto bactérias originárias do trato gastrintestinal de humanos e outros animais de sangue quente (*Escherichia coli*), como também bactérias não entéricas (espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*, dentre outras) (SILVA, 2007).

3 OBJETIVOS

Os objetivos do estudo foram:

- 1 - Avaliar a qualidade microbiológica das carcaças submetidas ao pré-resfriamento por imersão em água, após 8 horas e após 16 horas de processamento industrial.
- 2 - Avaliar a qualidade microbiológica da água do *chiller* usado no pré-resfriamento por imersão em água, após 8 horas e após 16 horas de processamento industrial.
- 3 - Embasar discussão sobre a determinação do Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998), de esvaziamento completo, limpeza e desinfecção do *chiller* ao final de cada período de trabalho (8 horas).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências de um matadouro de aves localizado no Estado de São Paulo, registrado no Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA/SDA/MAPA) e sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Nesse matadouro, são abatidas 180.000 aves/dia (média), em 3 turnos de 8 horas cada.

Durante 18 dias, foram colhidas, por dia, 5 carcaças antes da introdução no sistema de pré-resfriamento, 1 h e 20 min antes do final do 1º turno de processamento, e 5 carcaças 1 h e 20 min antes do final do 2º turno. Ao final do 1º turno (01:00 h) e do 2º turno (09:00 h), foram colhidas uma amostra de 500 mL de água tratada usada no abastecimento do sistema de pré-resfriamento, uma amostra de 500 mL de água residente do *chiller* e 5 carcaças após a conclusão do pré-resfriamento (à saída do *chiller*).

No total, foram colhidas 36 amostras de água tratada, 36 amostras de água do *chiller*, 180 carcaças antes e 180 carcaças após a passagem pelo sistema de pré-resfriamento, sendo possível avaliar as alterações da carga microbiana no pré-resfriamento por imersão em água ao final de 8 horas (final do 1º turno) e de 16 horas (final do 2º turno) de processamento industrial de carcaças de frango. Entre o 1º e 2º turnos, não houve esvaziamento do *chiller*.

4.1 Procedimentos de colheita de amostras de água:

4.1.1 Água tratada: foram colhidas em frascos de vidro estéreis, diretamente do cano de abastecimento de um dos tanques do sistema de pré-resfriamento. No momento da colheita, foram determinadas a temperatura e a concentração de cloro residual livre da água que escoava desse tubo de abastecimento. Os frascos com as amostras foram imediatamente encaminhados ao laboratório da indústria, localizado no recinto do estabelecimento. No laboratório, as amostras foram estocadas em refrigerador (2 a 8°C) pelo prazo máximo de 6 horas até o momento das análises de pH, aeróbios mesófilos, coliformes a 35°C e *E. coli*.

4.1.2 Água de *chiller*: foram colhidas em frascos plásticos estéreis, diretamente de uma torneira instalada neste tanque. Neste momento, foram determinadas a temperatura e a concentração de cloro residual livre da água que escoava dessa torneira instalada no *chiller*. Os frascos com as amostras foram imediatamente encaminhados ao laboratório da indústria. No laboratório, as amostras foram estocadas em refrigerador (2 a 8°C) pelo prazo máximo de 6 horas até o momento das análises de pH, aeróbios mesófilos, coliformes a 35°C e *E. coli*.

4.2 Análises físico-químicas de água:

4.2.1 Temperatura: foi determinada com uso de termômetro manual.

4.2.2 Concentração de cloro residual livre: foi determinada com uso de colorímetro da marca Digimed®, de acordo com instruções do fabricante.

4.2.3 pH: foi determinado com uso de pH-metro da marca Micronal®, de acordo com instruções do fabricante.

4.3 Análises microbiológicas de água:

4.3.1 Contagem de aeróbios mesófilos:

4.3.1.1 Água tratada: foi inoculado em placa de Petri estéril 1 mL da amostra colhida, com a adição de 15 mL de ágar padrão para contagem (PCA) fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C. O ágar com o inóculo foi homogeneizado. A placa foi deixada em repouso até a solidificação do ágar e incubada a 36±1°C por 48 h. O resultado foi expresso em UFC/mL.

4.3.1.2 Água do *chiller*: foi inoculado em placa de Petri estéril 1 mL de amostra diluída em água destilada estéril (10⁻²), sendo então adicionados 15 mL de ágar padrão para contagem (PCA) fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C. O ágar com o inóculo foi homogeneizado. A placa foi deixada em

repouso até a solidificação do ágar e incubada a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h. O resultado foi ajustado considerando a diluição utilizada e expresso em UFC/mL.

4.3.2 Contagem de coliformes a 35°C /*E. coli*:

4.3.2.1 Água tratada: foram transferidos para um saco plástico estéril 100 mL da amostra colhida, sendo então adicionado o conteúdo de um blíster de ReadyCult® Coliform 100. Promoveu-se uma leve agitação para dissolução completa dos grânulos. A seguir, alíquotas de 10 mL da amostra foram transferidas para tubos de ensaio estéreis, sendo os mesmos incubados a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. Os tubos que apresentaram cor azul esverdeada (após 4 h de incubação adicional, se necessário) foram considerados positivos para coliformes a 35°C . Os tubos que apresentaram fluorescência azulada quando expostos à luz ultravioleta (365 nm) foram considerados positivos para *E. coli*. Os resultados foram obtidos com uso de uma tabela NMP e expressos em NMP/mL.

4.3.2.2 Água do chiller: a partir da amostra original foram realizadas diluições decimais até 10^{-3} . A seguir, 100 mL desta última diluição foram transferidos para um saco plástico estéril, repetindo-se a partir daí os mesmos procedimentos descritos no item anterior.

4.4 Procedimentos de colheita de carcaças:

4.4.1 Carcaças antes do pré-resfriamento: foram colhidas 1 h e 20 min antes do final do turno, após o chuveiro final da seção de evisceração, acondicionadas individualmente em sacos plásticos estéreis e encaminhadas imediatamente ao laboratório da indústria. No laboratório, foi feito um *pool* de 25 g com as 5 carcaças colhidas. Nessa amostra, foram realizadas as contagens de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, coliformes a 35°C e *E. coli*.

4.4.2 Carcaças após o pré-resfriamento: foram colhidas ao final do turno, à saída do *chiller*, acondicionadas individualmente em sacos plásticos estéreis e encaminhadas imediatamente ao laboratório da indústria. No momento da colheita, foi determinada a média das temperaturas das 5 carcaças colhidas com uso de termômetro manual. No laboratório, foi feito um *pool* de 25 g à semelhança do item anterior, sendo realizadas as contagens de aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, coliformes a 35°C e *E. coli*.

4.5 Análises microbiológicas de carcaças de frango:

4.5.1 Preparo da amostra: foram pesados, assepticamente, em um saco plástico estéril, fragmentos de pele e músculo das regiões pericloacal, coxas, asas, peito e pescoço de 5 carcaças. Os fragmentos constituíram um *pool* de $25 \pm 0,2$ g (5 g/carcaça). A seguir, 225 mL de água peptonada tamponada foram adicionados ao saco e a mistura homogeneizada por 2 min em *stomacher*.

4.5.2 Contagem de aeróbios mesófilos: foi dispensado 1 mL das diluições decimais seriadas das amostras realizadas com solução salina peptonada 0,1% estéril no centro do filme inferior de placa Petrifilm para contagem de mesófilos. O filme superior foi rolado sobre a amostra diluída para evitar apreensão de bolhas de ar. Um difusor plástico foi colocado, com o lado rebaixado para baixo, no centro da placa, e pressionado levemente para distribuir a amostra uniformemente. O inóculo foi espalhado sobre toda a área de crescimento da placa Petrifilm antes do gel se formar. A placa foi deixada em repouso durante pelo menos um minuto para permitir a solidificação do gel. A seguir, as placas foram incubadas na posição horizontal com o lado transparente para cima por 48 ± 3 h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Colônias vermelhas, independente do tamanho ou intensidade, foram contadas, com o uso de um contador de colônias, como aeróbios mesófilos. O resultado foi ajustado considerando a diluição utilizada e expresso em UFC/g.

4.5.3 Contagem de coliformes a 35°C/E. coli: foi dispensado 1 mL das diluições decimais seriadas das amostras realizadas com solução salina

peptonada 0,1% estéril no centro do filme inferior de placa Petrifilm para contagem de coliformes a 35 °C/*E. coli*. As placas foram incubadas na posição horizontal com o lado transparente para cima por 24±2 h a 35±1°C. A contagem de coliformes a 35 °C consistiu da somatória das colônias vermelhas, azuis ou vermelho azuladas associadas ao gás formado (dentro do diâmetro de uma colônia). Colônias azuis a vermelho azuladas associadas ao gás formado, independente de tamanho ou intensidade de cor, foram contadas, com o uso de um contador de colônias, como *E. coli*. O resultado foi ajustado considerando a diluição utilizada e expresso em UFC/g.

4.5.4 Contagem de Enterobacteriaceae: foi dispensado 1 mL das diluições decimais seriadas das amostras realizadas com solução salina peptonada 0,1% estéril no centro do filme inferior de placa Petrifilm para contagem de Enterobacteriaceae. As placas foram incubadas na posição horizontal com o lado transparente para cima por 24±2 h a 35±1°C. Colônias vermelhas associadas ao gás formado e com halo amarelo, vermelhas associadas ao gás formado sem halo amarelo e vermelhas com halo amarelo sem bolha(s) de gás foram contadas, com o uso de um contador de colônias, como Enterobacteriaceae. O resultado foi ajustado em relação à diluição utilizada e expresso em UFC/g.

4.6 Cálculo de renovação contínua de água

A renovação contínua de água do *chiller* foi calculada através da divisão do resultado da subtração do valor numérico registrado em hidrômetro ao final de uma hora pelo valor numérico registrado em hidrômetro do início desse período pelo número de aves abatidas nesse intervalo de tempo (obtido através da velocidade de abate).

4.7 Procedimento estatístico

Todos os valores obtidos nas contagens bacterianas foram convertidos para \log_{10} .

No caso da água do *chiller*, os resultados microbiológicos foram analisados estatisticamente através da técnica de análise de variância para o modelo com 1 fator (ZAR, 1999).

Os valores oriundos das análises microbiológicas de carcaças colhidas antes e após o pré-resfriamento por imersão em água foram analisados estatisticamente pela técnica da análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas (JOHNSON & WICHERN, 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Considerações gerais

As amostras de água tratada usada no abastecimento do *chiller* foram colhidas e analisadas para verificar se a temperatura, o pH, a cloração e as concentrações de aeróbios mesófilos, coliformes a 35 °C e *E. coli*, obedeciam aos padrões exigidos pela legislação ao produto empregado no processamento industrial de carcaças de frango (BRASIL, 2004). Nas cinco avaliações (13,89%) em que a concentração de cloro residual livre foi menor que o valor mínimo exigido (0,5 mg/L), ações corretivas foram desencadeadas imediatamente com o objetivo de restabelecer o padrão.

O cálculo da renovação de água do *chiller* e da temperatura média das carcaças também teve como objetivo verificar se esses parâmetros estavam adequados durante os períodos de colheita de material.

Na seção de anexos, encontram-se os resultados de cada análise realizada.

5.2 Avaliação microbiológica da água residente do *chiller*

Na Tabela 1, pode-se observar que a qualidade microbiológica da água do *chiller* após 8 horas de trabalho (final do 1° turno) foi equivalente àquela observada após 16 horas (final do 2° turno), mesmo sem que tenham ocorrido o esvaziamento, a limpeza e a desinfecção deste tanque até o final do 2° turno.

TABELA 1. Média e desvio padrão das contagens de aeróbios mesófilos (\log_{10} UFC/mL), de coliformes a 35 °C (NMP/mL) e de *E. coli* (NMP/mL) da água do *chiller* segundo tempo de processamento.

Análise	Tempo de processamento	
	8 h	16 h
Mesófilos	3,65 ± 0,40 ^a	3,67 ± 0,32 ^a
Coliformes a 35 °C	4,10 ± 0,26 ^a	4,21 ± 0,18 ^a
<i>E. coli</i>	3,91 ± 0,41 ^a	4,12 ± 0,30 ^a

*valores seguidos de letras distintas nas linhas diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Em estudo de Huevo et al. (2007), as contagens médias de coliformes a 35°C e de *E. coli* em amostras de água do *chiller* foram 3,1 e 2,9 log₁₀ UFC/mL, respectivamente. No Brasil, Soares et al. (2002) encontraram valores de 2,13 log₁₀ NMP de coliformes a 35°C/mL e 2,12 log₁₀ NMP de *E. coli*/mL de água do *chiller*. Outro estudo brasileiro obteve como média dos resultados de análise de água do *chiller* 2,53 log₁₀ de aeróbios mesófilos/100mL, 2,17 log₁₀ NMP de coliformes a 35°C/100mL e 0,28 log₁₀ NMP de *E. coli*/100mL (ISOLAN, 2007). Os resultados de todos esses trabalhos mostraram valores médios inferiores aos desta pesquisa. No entanto, ressalta-se que, ao final de 16 horas, as contagens não foram estatisticamente diferentes do que as observadas após 8 horas.

5.3 Avaliação microbiológica das carcaças de frango

Na Tabela 2, pode-se observar que as contagens dos quatro grupos de indicadores microbiológicos estudados - aeróbios mesófilos, Enterobacteriaceae, coliformes a 35°C e *E. coli* - foram reduzidas significativamente ($p < 0,05$) após a passagem das carcaças pelo sistema de pré-resfriamento ao final do 1º turno (8 horas) e do 2º turno (16 horas), sem que tenham ocorrido o esvaziamento e a higienização do *chiller* durante esse período.

TABELA 2. Média e desvio padrão das contagens de aeróbios mesófilos (log₁₀ UFC/g), de Enterobacteriaceae (log₁₀ UFC/g), de coliformes a 35°C (log₁₀ UFC/g) e de *E. coli* (log₁₀ UFC/g) em carcaças segundo tempo de processamento e ponto de colheita das amostras.

Análise	Tempo de processamento	Ponto de colheita	
		Antes	Após
Mesófilos	8 h	5,90 ± 0,89 ^{ab}	5,02 ± 0,42 ^{aA}
	16 h	6,17 ± 0,61 ^{ab}	4,83 ± 0,46 ^{aA}
Enterobacteriaceae	8 h	4,54 ± 1,20 ^{ab}	3,32 ± 0,35 ^{aA}
	16 h	4,61 ± 0,68 ^{ab}	3,25 ± 0,58 ^{aA}

Coliformes a 35°C	8 h	4,45 ± 1,30 ^{aB}	3,10 ± 0,77 ^{aA}
	16 h	3,89 ± 0,62 ^{aB}	2,83 ± 0,64 ^{aA}
<i>E. coli</i>	8 h	3,91 ± 1,30 ^{aB}	2,65 ± 0,59 ^{aA}
	16 h	3,30 ± 0,89 ^{aB}	1,96 ± 1,21 ^{aA}

*valores seguidos de letras minúsculas e maiúsculas distintas nas colunas e linhas, respectivamente, diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

O resultado da média das contagens de aeróbios mesófilos em carcaças colhidas antes do *chiller* ao final do 1º turno (8 horas) foi de 5,90 log₁₀ UFC/g. Após a passagem pelo sistema de pré-resfriamento por imersão, esse número foi reduzido para 5,02 log₁₀ UFC/g ($p < 0,05$). A redução na contagem de aeróbios mesófilos em carcaças submetidas ao pré-resfriamento também ocorreu ao final do 2º turno (16 horas). A média de 6,17 log₁₀ UFC/g constatada nas carcaças colhidas antes do *chiller* foi reduzida para 4,83 log₁₀ UFC/g nas carcaças amostradas após o pré-resfriamento ($p < 0,05$). Observa-se ainda que não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nas contagens observadas após 8 horas e 16 horas ($p > 0,05$).

As contagens de Enterobacteriaceae observadas nas carcaças antes do pré-resfriamento foram 4,54 e 4,61 log₁₀ UFC/g ao final do 1º e do 2º turnos, respectivamente. O pré-resfriamento por imersão reduziu as contagens para 3,32 (8 horas) e 3,25 log₁₀ UFC/g (16 horas), reduções, portanto, significativas ($p < 0,05$). Observa-se, mais uma vez, que não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nas contagens de Enterobacteriaceae ao final de 16 horas quando comparadas às de 8 horas.

O *chiller* teve um efeito significativo ($p < 0,05$) na redução de coliformes a 35°C na superfície das carcaças após o pré-resfriamento tanto ao final de 8 horas quanto ao final de 16 horas de processamento. A redução foi de 4,45 para 3,10 log₁₀ UFC/g após o pré-resfriamento ao final do 1º turno e de 3,89 para 2,83 log₁₀ UFC/g ao final do 2º turno. As contagens ao final de 8 e de 16 horas, ao contrário, não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Os resultados mostram ainda uma redução nas contagens de *E. coli* de 3,91 para 2,65 log₁₀ UFC/g após o pré-resfriamento ao final do 1º turno (8 horas de processamento) e de 3,30 para 1,96 log₁₀ UFC/g ao final do 2º turno

(16 horas). Assim como relatado para mesófilos, enterobactérias e coliformes a 35°C, as contagens de *E. coli* após 8 e 16 horas de trabalho não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$).

Outros pesquisadores obtiveram resultados similares, confirmando que o pré-resfriamento por imersão reduz a carga microbiana na superfície das carcaças de frango (CASON et al., 1997; BERSOT, 2002; SOARES et al., 2002; NORTHCUTT et al., 2003; CASON et al., 2004; SMITH et al., 2005; GALHARDO et al., 2006; NORTHCUTT et al., 2006; HUEZO et al., 2007; ISOLAN, 2007; NORTHCUTT et al., 2008; RODRIGUES et al., 2008).

No entanto, em muitas publicações que comparam as contagens bacterianas nas carcaças de frango resfriadas, o grande número de variáveis, como a carga bacteriana das carcaças antes do pré-resfriamento, o uso de antimicrobianos ou as diferenças nas técnicas microbiológicas de amostragem, torna difícil uma comparação direta entre os resultados obtidos (HUEZO et al., 2007).

No Brasil, Bersot et al. (2002) relataram uma média das contagens de aeróbios mesófilos nas carcaças colhidas antes e após o pré-resfriamento de $4,33 \log_{10}$ UFC/m² e $3,44 \log_{10}$ UFC/cm², respectivamente, com uma diferença significativa de $0,89 \log_{10}$ UFC/cm².

Nos Estados Unidos, o efeito do pré-resfriamento por imersão foi observado em laboratório por Cason et al. (2004), que usaram um protótipo de *chiller* contendo gelo e água de torneira sem cloro adicional. A amostragem das metades de carcaças usadas no experimento foi feita por enxágue. Os resultados mostraram diminuição de aproximadamente $0,7 \log_{10}$ UFC nas contagens de Enterobacteriaceae, coliformes a 35°C e *E. coli* obtidas nas metades das carcaças avaliadas após o pré-resfriamento quando comparadas às amostradas antes da imersão no *chiller*.

Estudo brasileiro de Galhardo et al. (2006) demonstrou que os tanques de pré-resfriamento não foram eficazes na descontaminação de carcaças de frango. No entanto, os autores observaram que os valores inadequados de fluxo de água e de temperatura nos tanques analisados podem ter sido responsáveis pela pouca eficiência dos mesmos na remoção de microrganismos contaminantes.

Northcutt et al. (2006) estudaram o impacto bacteriológico do uso de diferentes volumes de água durante o pré-resfriamento de carcaças de frango por imersão. No experimento, realizado em laboratório, metades de carcaças foram resfriadas dentro de sacos plásticos contendo diferentes volumes de água destilada a 4°C. Não foi adicionado cloro à água. Os sacos contendo as metades de carcaças eram imersos por 45 min em um tanque que também continha água gelada. A amostragem foi realizada através de enxágue das metades de carcaça, antes e depois do pré-resfriamento.

Quando utilizaram o volume de 2,1 L de água destilada/kg de carcaça nos sacos plásticos, o mais próximo do observado nas indústrias, Northcutt et al. (2006) identificaram contagens 1,5 log₁₀ UFC/mL de enxágue (para aeróbios mesófilos), 1,2 log₁₀ UFC/mL (para Enterobacteriaceae) e 2,0 log₁₀ UFC/mL (para *E. coli*) menores nas metades de carcaças amostradas depois do pré-resfriamento. 5,2 log₁₀ UFC/mL de aeróbios mesófilos foram reduzidos pelo pré-resfriamento a 3,7 log₁₀ UFC/mL. Os números de Enterobacteriaceae obtidos antes e após o tratamento foram, respectivamente, 3,8 e 2,6 log₁₀ UFC/mL de enxágue. A média logarítmica das contagens de *E. coli* diminuiu de 4,5 log₁₀ UFC/mL de enxágue antes do pré-resfriamento para 2,5 log₁₀ UFC/mL depois.

Huezo et al. (2007) investigaram os efeitos do método de pré-resfriamento nas contagens e prevalência de coliformes a 35°C, *E. coli*, *Campylobacter* e *Salmonella* recuperados de carcaças de frango. Neste experimento, as carcaças foram submetidas ao pré-resfriamento também em um protótipo de *chiller* contendo água potável, e não durante o processamento industrial. Para as análises laboratoriais, foi realizado o enxágue das carcaças amostradas. Os autores constataram reduções de 1,0 log₁₀ UFC/mL de enxágue nas contagens de coliformes a 35°C (de 3,8 antes do pré-resfriamento para 2,8 log₁₀ UFC/mL após) e de 0,9 log₁₀ UFC/mL nas contagens de *E. coli* (de 3,5 para 2,6 log₁₀ UFC/mL). Os números de *Campylobacter* e *Salmonella* também diminuíram significativamente em 1,0 e 0,6 log₁₀ UFC/mL, respectivamente.

Isolan (2007), em trabalho realizado em um matadouro localizado no Brasil, com volume médio de abate diário de 150.000 aves, identificou redução significativa nas contagens de aeróbios mesófilos (de 4,75 para 3,53 log₁₀

UFC/g), de coliformes a 35 °C (de 3,2 para 1,88 log₁₀ UFC/g) e de *E. coli* (de 0,79 para 0,10 log₁₀ UFC/g) em carcaças de frango submetidas a pré-resfriamento em um sistema que funcionara durante 8 horas.

Northcutt et al. (2008) conduziram uma pesquisa para determinar os efeitos do tratamento e reuso de água do *chiller* na qualidade microbiológica de carcaças de frango processadas em uma planta comercial. O pré-resfriamento por imersão em tanques contendo água de reuso misturada a água fresca reduziu as contagens de coliformes a 35 °C, *E. coli* e *Campylobacter* em 1,5, 1,5 e 2,0 log₁₀ UFC/mL de enxágue, respectivamente. A prevalência de *Salmonella* nas carcaças – 25% (antes) e 22% (depois) – não foi afetada pelo pré-resfriamento (NORTHCUTT et al., 2008).

Rodrigues et al. (2008) constataram que as contagens de aeróbios mesófilos de 3,7 log₁₀ UFC/cm² diminuíram para 1,7 na saída do *chiller*, que 3,2 NMP/cm² de coliformes a 35 °C diminuíram para 0,7, e que 0,6 NMP/cm² de *E. coli* diminuiu para 0,1 em um estabelecimento brasileiro com volume médio de abate de 165.000 aves/dia.

Considerando os resultados obtidos e a literatura consultada, algumas hipóteses sobre os fatores que determinam a redução nas contagens microbiológicas em carcaças de frango submetidas ao pré-resfriamento pelo método de imersão em água podem ser elaboradas.

Primeiramente, a movimentação das carcaças em sentido contrário ao fluxo de água nos tanques de pré-resfriamento (contracorrente) remove mecanicamente as bactérias contaminantes das carcaças, simultaneamente, a renovação constante da água residente destes tanques promove a retirada desses microrganismos do sistema. De acordo com Isolan (2007), a maior vazão de água está associada à menor contagem de aeróbios mesófilos na água do *chiller*. Além disso, esses dois procedimentos evitam o acúmulo de matéria orgânica no interior dos resfriadores (ISOLAN, 2007), reduzindo a disponibilidade de substratos que poderiam servir à multiplicação bacteriana.

Conclui-se, portanto, que este contrafluxo de água é determinante na qualidade microbiológica do sistema, pois diminui a possibilidade dos resfriadores tornarem-se focos de contaminação na indústria de carne de aves, visto que foram reduzidas as contagens de todos os subgrupos bacterianos e,

consequentemente, a contagem bacteriana total nas carcaças de frango (PETRAK et al., 1999).

O controle de temperatura da água do *chiller* ($\leq 4^{\circ}\text{C}$ no ponto de saída das carcaças) durante o processamento é outro fator relevante na redução das contagens microbiológicas (VOIDEROU, 2007). A redução da temperatura limita a multiplicação bacteriana porque todas as reações metabólicas são catalisadas por enzimas, sendo estas dependentes da temperatura (JAY, 2005).

Quanto a concentração de cloro residual livre, dos 18 resultados obtidos em amostras de água residente do *chiller*, 17 (94,44%) foram iguais a 0,0 mg/L. Conclui-se, portanto, que abastecer o tanque com água clorada não implicou necessariamente submeter a microbiota das carcaças à ação do cloro, mesmo assim, os resultados revelaram reduções significativas nas contagens bacterianas. Os dados condizem com a literatura. Em nenhum dos trabalhos consultados foi usada água com concentração de cloro residual livre superior a 2,0 mg/L, porém, os resultados foram similares. Northcutt et al. (2006) obtiveram redução de 2,0 \log_{10} UFC/mL de enxágue para *E. coli* mesmo usando água destilada no pré-resfriamento.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1 - A renovação de água constante e contracorrente, associada ao controle da temperatura da água do *chiller*, foram suficientes para reduzir significativamente a contaminação das carcaças após a passagem pelo sistema de pré-resfriamento por imersão.

2 - Outros trabalhos devem ser realizados para esclarecer, de modo isolado, a eficácia da cloração da água do *chiller* a concentrações inferiores a 5,0 mg/L (valor máximo permitido pela legislação brasileira) na redução das contagens bacterianas das carcaças submetidas a pré-resfriamento por imersão.

3 - A redução média nas contagens de aeróbios mesófilos e de enterobactérias esteve de acordo com as exigências governamentais de qualidade microbiológica do sistema de pré-resfriamento do Brasil e dos Estados-membros da União Europeia.

7 CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos, conclui-se que:

1 – O período de 8 horas de utilização do *chiller* sem que seja promovido o seu esvaziamento completo, pode ser ampliado para 16 horas, já que não foram evidenciadas alterações significativas na qualidade microbiológica da água utilizada no processo, bem como nas carcaças resfriadas durante esse período.

2 – Tais resultados conferem um suporte técnico-científico para discussão sobre alteração da legislação federal no tocante à etapa de pré-resfriamento das carcaças durante o abate de aves.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO. Relatório Anual 2008/2009. São Paulo, 2009. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf>. Acesso em 21 out. 2009.

BERSOT, L. S. Efeito do pré-resfriamento em *chiller* sobre a contaminação superficial de carcaças de frango. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado. **Resumos**. Gramado: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2002. cc. spu, n.183.

BRASIL. Portaria N° 210, de 10 de novembro de 1998. Diário Oficial da União, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, DF, 26 nov. 1998. Seção 1, p. 226.

BRASIL. Instrução Normativa N° 3, de 17 de janeiro de 2000. Diário Oficial da União, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, DF, 24 jan. 2000. Seção 1, p. 14.

BRASILa. Instrução Normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASILb. Instrução Normativa N° 70, de 06 de outubro de 2003. Diário Oficial da União, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, DF, 10 out. 2003. Seção 1, p. 9.

BRASIL. Portaria N° 518, de 25 de março de 2004. Diário Oficial da União, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266-270.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Coordenação Geral de Programas Especiais. **Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole (Versão Preliminar)**. Brasília, 2005. 38p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Coordenação Geral de Inspeção. Divisão de Inspeção de Carne de Aves e Ovos. **Padronização de Procedimentos de Controle da Fiscalização de Estabelecimentos Produtores de Carne de Aves e Ovos e das Auditorias da DICA/O/CGI/DIPOA nos Estados**. Brasília, 2007. 6p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem

Animal. Coordenação Geral de Inspeção. Divisão de Inspeção de Carne de Aves e Ovos. **Procedimento de investigação mediante detecção de *Salmonella* spp. em carne de aves brasileiras, por países terceiros.** Brasília, 2008. 7p.

BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** 2.ed. Nova York: Springer Science + Business Media Inc., 2005. 721p.

CASON, J.A.; BAILEY, J.S.; STERN, N.J.; WHITTEMORE, A. D.; COX, N.A. Relationship Between Aerobic Bacteria, Salmonellae, and *Campylobacter* on Broiler Carcasses. **Poultry Science**, v.76, p.1037-1041, 1997.

CASON, J.A.; BERRANG, M.E.; BUHR, R.J.; COX, N.A. Effect of Prechill Fecal Contamination on Numbers of Bacteria Recovered from Broiler Chicken Carcasses Before and After Immersion Chilling. **J. Food Prot.**, v.67, p.1829-1833, 2004.

CEE - COMUNIDADE ECONÔMICA EUROPEIA. Conselho da Comunidade Europeia. Diretiva 92/116/CEE. Bruxelas, 1992.

GALHARDO, J.A.; LOPES, M.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; FREITAS, J.C.; MÜLLER, E.E. Eficácia dos tanques de pré-resfriamento na redução de contaminação bacteriana em carcaças de frango. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, p.647-656, 2006.

HUEZO, R.; NORTH CUTT, J.K.; SMITH, D.P.; FLETCHER, D.L.; INGRAM, K.D. Effect of Dry Air or Immersion Chilling on Recovery of Bacteria from Broiler Carcasses. **J. Food Prot.**, v.70, p.1829-1834, 2007.

ISOLAN, L.W. **Estudo da eficiência da etapa de pré-resfriamento por imersão em água no controle da qualidade microbiológica das carcaças de frango.** 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

JAMES, C.; VINCENT, C.; ANDRADE LIMA, T.I.; JAMES, S.J. The primary chilling of poultry carcasses – a review. **Int. J. of Refrig.**, v.29, p.847-862, 2006.

JAY, J.M. **Microbiologia dos alimentos.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied Multivariate Statistical Analysis.** 5.ed. Nova Jersey: Prentice Hall, Inc., 2002. 708p.

NORTH CUTT, J.K.; BERRANG, M.E.; DICKENS, J.A.; FLETCHER, D.L.; COX, N.A. Effect of Broiler Age, Feed Withdrawal, and Transportation on Levels of Coliforms, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella* on Carcasses Before and After Immersion Chilling. **Poultry Science**, v.82, p.169-173, 2003.

NORTHCUTT, J.K.; CASON, J.A.; SMITH, D.P.; BUHR, R.J.; FLETCHERT, D.L. Broiler Carcass Bacterial Counts After Immersion Chilling Using Either a Low or High Volume of Water. **Poultry Science**, v.85, p.1802-1806, 2006.

NORTHCUTT, J.K.; SMITH, D.; HUEZO, R.I.; INGRAM, K.D. Microbiology of Broiler Carcasses and Chemistry of Chiller Water as Affected by Water Reuse. **Poultry Science**, v.87, p.1458-1463, 2008.

PETRAK, T.; KALODERA, Z.; NOVAKOVIĆ, P.; GUMHALTER KAROLYI, L. Bacteriological comparison of parallel and counter flow water chilling of poultry meat. **Meat Science**, v.53, p.269-271, 1999.

RODRIGUES, A.C.A.; PINTO, P.S.A.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; PINTO, M.S.; NERO, L.A. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. **Ciência Rural**, v.38, p.1948-1953, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2007. 536p.

SMITH, D.P.; CASON, J.A.; BERRANG, M.E. Effect of Fecal Contamination and Cross-Contamination on Numbers of Coliform, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* on Immersion-Chilled Broiler Carcasses. **J. Food Prot.**, v.68, p.1340-1345, 2005.

SOARES, J.; BENNITEZ, L.B.; TERRA, N.N. Análise de Pontos Críticos no Abate de Frangos, através da utilização de indicadores microbiológicos. **Higiene Alimentar**, v.16, p.53-61, 2002.

VOIDAROU, C.; VASSOS, D.; KEGOS, T.; KOUTSOTOLI, A; TSIOTSIAS, A.; SKOUFOS, J.; TZORA, A.; MAIPA, V.; ALEXOPOULOS, A.; BEZIRTZOGLIOUS, E. Aerobic and Anaerobic Microbiology of the Immersion Chilling Procedure During Poultry Processing. **Poultry Science**, v.86, p.1218-1222, 2007.

ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**, 4th ed., New Jersey: Prentice Hall, 1999, 663 p.

9 TRABALHO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CARCAÇAS DE FRANGO EM UM SISTEMA DE PRÉ-RESFRIAMENTO POR IMERSÃO EM 8 HORAS E 16 HORAS

Trabalho a ser enviado para o *Journal Food Protection*

9.1 Normas gerais para publicação na revista

Os trabalhos enviados ao *Journal Food Protection* devem ser digitados em espaço duplo, com fonte tamanho 10 incluindo referências, tabelas, legendas de tabelas, notas de rodapé e legendas. Os trabalhos devem ser feitos em Word, WordPerfect ou editores de texto. As margens da página de todos os lados devem ser de pelo menos 2,5 cm de largura. As linhas das páginas devem ser numeradas para facilitar a análise dos documentos, mas a versão final dos manuscritos não deve ter números de linha. Os trabalhos devem ser divididos em seções, que devem ser dispostos na seguinte ordem: Título, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, referências, legendas de figuras e tabelas.

1 **RESEARCH PAPER**

2
3 **Running title:** Microbiological evaluation of chicken carcasses in a pre-chilling system

4
5
6 **Title:** Microbiological evaluation of chicken carcasses in a pre-chilling system by immersion for 8 hours and 16
7 hours

8
9 **Authors:** Souza-Júnior, L.C.T.¹, Pereira, J.G.², Spina, T.L.B.², Izidoro, T.B.², Oliveira, A.C.¹, Pinto*, J.P.A.N.²

10
11 ¹Federal Inspection Service, Brazilian Ministry of Agriculture Livestock and Food Supply (Rua Treze de Maio,
12 1558 - 6º andar, Bela Vista - CEP 01327-002 - São Paulo/SP, Brazil. Phone: +55 11 3283 5695

13 ²School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University, Campus of Botucatu, Sao
14 Paulo, Brazil. PO Box 572. Phone: +55 14 3811 6273

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27 **Key words:** Chicken; Microbiological evaluation; Pre-chilling.

28
29 *Author for correspondence: Tel: +55 14 3811 6273; Fax: +55 14 3815 6024

30 E-mail: josepaes@fmvz.unesp.br

1 **ABSTRACT**

2 Since 2004 Brazil remains the leading exporter of chicken meat. Due to the importance of this sector in the
3 Brazilian economy, it is essential to ensure the food safety produced by controlling and monitoring the
4 production stages susceptible to contamination, such as the chilling. This study aimed to evaluate changes in
5 microbial load on chicken carcasses and chilling water residing in immersion chilling system in water after 8 and
6 16 hours of industrial processing. It is also an objective to underlie the discussion on the Brazilian Ministry of
7 Agriculture Livestock and Food Supply normative that determines complete empty, clean and disinfection of
8 each tank of the system at the end of every 8 hours. Prechill and postchill carcasses were obtained and analyzed
9 for mesophiles, Enterobacteriaceae, coliforms at 35°C and Escherichia coli. Samples of clean water consumed in
10 the system and the chiller water were also taken and analyzed for mesophiles, coliforms at 35°C and E. coli. The
11 results obtained do not justify a determination to empty the tank after 8 hours and thus this period could be
12 extended to 16 hours, as all microbiological testing of both the water and the carcasses showed no statistically
13 significant difference in scores of microbiological indicators evaluated. These data give a technical and scientific
14 support for discussion of change in federal law regarding the management of the water in a immersion chilling
15 system during poultry slaughter.

16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

1 Brazil is the largest exporter of poultry meat in the world (1). Maintaining this status requires the
2 adoption of measures to ensure the sanitary quality of food during various stages of production. During
3 slaughter, pre-cooling of carcasses is considered one of the main points of contamination, requiring constant
4 monitoring (11).

5 Paradoxically, cooling is one of the key steps to maintain the quality of chicken meat, because it delays
6 the natural changes that occur after the slaughter, whether biochemical, physical or histological. Pre-cooling of
7 carcasses can be accomplished by immersion in cold water countercurrent flow, cold dry air or by a combination
8 of air and water spray (10).

9 When using the system of pre-cooling by immersion, a reduction in microbiological counts can be
10 observed, especially if the water used has some degree of chlorination (8). The countercurrent flow of water,
11 with the propulsion of chicken carcasses in the opposite direction to it, makes the cooling tank (chiller) an
12 ecosystem that can cause great stress to bacterial cells and thereby reduce the microbial load (18).

13 In the Member States of the European Union and in Brazil, carcasses subjected to pre-cooling by
14 immersion must pass through one or more tanks of water (or ice and water), whose content must be continuously
15 renewed. The temperature of the water flow measured at points of entry and exit of carcasses shall not exceed
16 16°C and 4°C, respectively. In addition, there must be strict control of parameters such as, for example, the
17 consumption of water used during the rinse spray before immersion, the water temperature in tanks and the
18 consumption during this processing (5).

19 Also in accordance with European legislation, which served as a model for the Brazilian legislation, the
20 operation of pre-cooling system should be monitored using microbiological methods, the contamination of
21 carcasses being evaluated by comparison of mesophilic and Enterobacteriaceae counts before and after
22 immersion. In EU Member States, each part of the device must be completely emptied, cleaned and disinfected,
23 when necessary, at the end of a work shift (8 hours) and at least once a day (5). This requirement is the subject of
24 disagreements, including the fact that the pre-cooling system by immersion involves the use of large quantities of
25 potable water, high cost of the treatment of effluents, as well as possible increased risk of cross contamination
26 (16).

27 Isolán (unpublished data) concluded that there is the possibility of ensuring the effectiveness of the pre-
28 cooling system by immersion in water even after 8 hours of operation without emptying and cleaning the tank,
29 however, but he suggested more studies to observe the behavior of the microbiological counts of the water
30 system and carcasses after a work shift of 8 hours.

1 Coliform counts at 35°C/*E. coli*: 1 ml of serial dilutions obtained as described in the previous item was
2 dispensed in the center of Petrifilm plates for coliform counts at 35°C/*E. coli*. The inoculum was spread with a
3 diffuser over the entire area of growth of the plate before the gel is formed. The diffuser was removed and the
4 plate allowed rest for at least one minute to permit solidification of gel, were counted, using a colony counter, as
5 *E. coli*. The result was expressed in CFU/g.

6 Enterobacteriaceae counts: 1 ml of each serial dilution was dispensed in the center of Petrifilm plates for
7 Enterobacteriaceae counts. The inoculum was spread with a diffuser over the entire area of growth of the plate
8 before the gel is formed. The diffuser was removed and the plate allowed rest for at least one minute to permit
9 solidification of the gel. The plates were incubated at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 h. Red colonies associated with the
10 produced gas and with yellow halo, red ones associated with the produced gas without yellow halo and red
11 colonies with yellow halo without gas bubble(s) gas were counted, using a colony counter, as
12 Enterobacteriaceae. The result was expressed in CFU/g.

13

14 **Statistical procedure.** The results of the bacterial counts of carcasses collected before and after pre-
15 cooling by immersion in water were transformed into log and statistically analyzed by the technique of analysis
16 of variance for the model of repeated measures in independent groups followed by the test of multiple
17 comparisons, adopting the 5% significance level (9).

18

19

RESULTS AND DISCUSSION

20 The values for the microbiological evaluation of the chicken carcasses before and after pre-cooling-
21 system, within 8 hours and 16 hours are presented in Table 1.

22 It is observed that a reduction in counts of aerobic mesophiles, Enterobacteriaceae, coliforms at 35°C
23 and *E. coli* after passage through pre-cooling system at the end of 1st shift (8 hours) and 2nd shift had occurred
24 without emptying, cleaning and disinfecting the chiller during these periods. Furthermore, analysis of water used
25 in the chiller showed that it fulfilled the potability standards required by MAPA, and it was not a source of
26 contamination to the products (data not shown).

27 Other researchers obtained similar results, confirming that pre-cooling by immersion reduces the
28 microbial load on chicken carcasses (3, 4, 6, 7, 12, 13, 14, 16, 17). This reduction, confirmed in the present
29 work, is due to some factors inherent in the pre-cooling system by immersion.

1 At first, the handling of carcasses in the opposite direction to the water flow in the pre-cooling tanks
2 (countercurrent) mechanically removes bacteria contaminating the carcasses, and, simultaneously, the constant
3 renewal of resident water of these tanks promotes the removal of these microorganisms in the system.
4 Consequently, this counterflow is crucial to maintaining the microbiological quality of this step, because it
5 reduces the possibility of the chillers become sources of contamination in poultry meat industry, since the counts
6 were reduced for all bacterial indicators evaluated (15).

7 The temperature control of the chiller water ($\leq 4^{\circ}\text{C}$ at the exit point of the carcasses of the system)
8 during processing is another important factor in reducing microbial counts, thus becoming an additional obstacle
9 to microbial growth (18).

10 The trend of reduction of up to 2 log in aerobic mesophilic and Enterobacteriaceae counts observed in this
11 study is in accordance with government requirements for the microbiological quality of pre-cooling system of
12 Brazil (2) and the Member States of the European Union (5).

13 For the concentration of free residual chlorine, the results obtained in 17 (94.44%) of 18 samples of water
14 chiller were equal to 0.0 mg / L. Therefore, the observed reductions in counts of indicator microorganisms were
15 not due to the action of chlorine. These data are consistent with the literature, since Northcutt et al. (14) showed
16 a reduction of 2.0 log CFU/ml rinse for *E. coli* even using distilled water in pre-cooling. Additional studies are
17 needed to specifically determine the effectiveness of chlorination of chiller water in reducing bacterial counts of
18 carcasses submitted to the pre-cooling by immersion.

19 The constant renewal of water in countercurrent system, associated with its temperature control were
20 sufficient, in the 16 analyzed hours to significantly reduce contamination of carcasses after passing through the
21 system of pre-cooling by immersion.

22 This study showed that this reduction was also significant at the end of 8 hours and 16 hours of work. So
23 the cycle of a chiller without emptying and cleaning, can be extended to 16 hours, since no significant alterations
24 were observed in the microbiological quality of refrigerated carcasses during this period.

25

26

27 **REFERENCES**

28 1. FAO. 2011. Food Outlook, Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO, Rome, Italy.

- 1 2. Brasil. 2007. Padronização de Procedimentos de Controle da Fiscalização de Estabelecimentos Produtores
2 de Carne de Aves e Ovos e das Auditorias da DICA/O/CGI/DIPOA nos Estados. Ministério da Agricultura,
3 Pecuária e Abastecimento. Brasília
- 4 3. Cason, J. A., J. S. Bailey, N. J. Stern, A. D. Whittemore, N. A. Cox. 1997. Relationship Between Aerobic
5 Bacteria, *Salmonellae*, and *Campylobacter* on Broiler Carcasses. *Poultry Science* 76:1037-1041.
- 6 4. Cason, J. A., M. E. Berrang, R. J. Buhr, N. A. Cox. 2004. Effect of Prechill Fecal Contamination on
7 Numbers of Bacteria Recovered from Broiler Chicken Carcasses Before and After Immersion Chilling. *J.*
8 *Food Prot.* 67:1829-1833.
- 9 5. European Economic Community. 1992. Council directive 92/116/EEC. Commission of the European
10 Communities, Brussels.
- 11 6. Galhardo, J. A., M. Lopes, J. T. Oliveira, R. Tamanini, S. F. Sanches, J. C. Freitas, E. E. Müller. 2006.
12 Eficácia dos tanques de pré-resfriamento na redução de contaminação bacteriana em carcaças de frango.
13 *Semina: Ciências Agrárias.* 27:647-656
- 14 7. Huezo, R., J. K. Northcutt, D. P. Smith, D. L. Fletcher, K. D. Ingram. 2007. Effect of Dry Air or Immersion
15 Chilling on Recovery of Bacteria from Broiler Carcasses. *J. Food Prot.* 70:1829-1834.
- 16 8. James, C., C. Vincent, T. I. Andrade Lima, S. J. James. 2006. The primary chilling of poultry carcasses – a
17 review. *Int. J. of Refrig.* 29:847-862.
- 18 9. Johnson, R. A., D. W. Wichern. 2002. Applied Multivariate Statistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey.
- 19 10. Lindblad, M., I. Hansson, I. Vågsholm, R. Lindqvist. 2006. Postchill *Campylobacter* Prevalence on Broiler
20 Carcasses in Relation to Slaughter Group Colonization Level and Chilling System. *J. Food Prot.* 69:495-
21 499.
- 22 11. Mead, G., A.M Lammerding, N. Cox, M.P. Doyle, F. Humbert, A. Kulikovskiy, A. Panin, V.P. do
23 Nascimento, M. Wierup and The *Salmonella* On Raw Poultry Writing Committee. 2010. Scientific and
24 technical factors affecting the setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective. *J. Food*
25 *Prot.* 73:1566-1590.
- 26 12. Northcutt, J. K., M. E. Berrang, J. A. Dickens, D. L. Fletcher, N. A. Cox. 2003. Effect of Broiler Age, Feed
27 Withdrawal, and Transportation on Levels of Coliforms, *Campylobacter*, *Escherichia coli* and *Salmonella*
28 on Carcasses Before and After Immersion Chilling. *Poultry Science.* 82:169-173
- 29 13. Northcutt, J. K., J.A. Cason, D. P. Smith, R. J. Buhr, D. L. Fletcher. 2006. Broiler Carcass Bacterial Counts
30 After Immersion Chilling Using Either a Low or High Volume of Water. *Poultry Science.* 85:1802-1806.

- 1 14. Northcutt, J. K., D. Smith, R. I. Huezo, K. D. Ingram. 2008. Microbiology of Broiler Carcasses and
2 Chemistry of Chiller Water as Affected by Water Reuse. *Poultry Science*. 87:1458-1463.
- 3 15. Petrak, T., Z. Kalodera, P. Novaković, L. Gumhalter Karolyi. 1999. Bacteriological comparasion of parallel
4 and counter flow water chilling of poultry meat. *Meat Science*. 53:269-271.
- 5 16. Smith, D.P., J.A. Cason, M. E. Berrang. 2005. Effect of Fecal Contamination and Cross-Contamination on
6 Numbers of Coliform, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, and *Salmonella* on Immersion-Chilled Broiler
7 Carcasses. *J. Food Prot.* 68:1340-1345.
- 8 17. Soares, J., L. B. Bennitez, N. N. Terra. 2002. Análise de Pontos Críticos no Abate de Frangos, através da
9 utilização de indicadores microbiológicos. *Higiene Alimentar*. 16:53-61.
- 10 18. Voidarou, C., D. Vassos, T. Kegos, A. Koutsotoli, A. Tsiotsias, J. Skoufos, A., Tzora, V. Maipa, A.
11 Alexopoulos, Bezirtzoglous E. 2007. Aerobic and Anaerobic Microbiology of the Immersion Chilling
12 Procedure During Poultry Processing. *Poultry Science*. 86: 1218-1222.

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

1 **TABLE 1.** Mean and standard deviation of mesophilic, aerobic Enterobacteriaceae, coliform and *E. coli* counts
 2 on carcasses according to throughput time and collection site of samples.

3

Analysis	Throughput time	Collection site	
	(Hours)	Before	After
Mesophiles	8	5.90 ± 0.89 aB	5.02 ± 0.42 aA
	16	6.17 ± 0.61 aB	4.83 ± 0.46 aA
Enterobacteriaceae	8	4.54 ± 1.12 aB	3.32 ± 0.34 aA
	16	4.61 ± 0.68 aB	3.25 ± 0.58 aA
Coliforms	8	4.45 ± 1.30 aB	3.10 ± 0.77 aA
	16	3.88 ± 0.62 aB	2.83 ± 0.64 aA
<i>E. coli</i>	8	3.90 ± 1.30 aB	2.65 ± 0.59 aA
	16	3.30 ± 0.89 aB	1.96 ± 1.20 aA

4 *Values followed by same small letters in columns are not statistically different (p>0.05).*

5 *Values followed by different capital letters in rows differ statistically (p<0.05)*

6 .

10 ANEXOS

QUADRO 1. Resultados de análises de água tratada (abastecimento do *chiller*).

Análise	Mesófilos (log ₁₀ UFC/mL)		Coliformes a 35°C (NMP/mL)		<i>E. coli</i> (NMP/mL)		CRL (mg/L)		pH		T (°C)	
	8h	16h	8h	16h	8h	16h	8h	16h	8h	16h	8h	16h
1	*	*	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,66	1,13	6,34	6,72	4,7	3,4
2	0,3	*	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	2,0	1,50	7,29	7,10	2,9	3,6
3	0	0,48	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,98	0,93	7,64	7,40	1,3	3,8
4	*	*	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,85	0,62	7,33	7,39	1,7	3,9
5	0	*	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,79	0,94	6,81	6,98	1,7	4,4
6	0	0,78	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,67	0,91	7,15	7,40	2,3	4,8
7	1,30	0	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,54	1,01	8,10	7,23	1,9	3,8
8	0	2,62	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,88	1,04	7,17	7,63	1,9	2,5
9	0	0,95	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1,0	0,0	8,29	8,40	3,1	3,9
10	0,30	0,30	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,53	0,0	8,11	8,20	3,7	2,4
11	0	*	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1,37	1,19	8,49	8,18	3,2	3,5
12	*	*	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1,30	0,92	7,91	7,67	3,2	1,9
13	0,48	0,30	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,94	0,61	8,07	8,27	2,7	2,7
14	0,30	0,85	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	1,11	0,9	7,86	8,16	2,7	3,4
15	*	*	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,98	0,61	7,88	8,56	3,0	2,7
16	0	0,5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,77	0,0	8,06	8,40	2,4	2,2
17	0	0	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,61	0,0	8,24	8,43	3,6	2,9
18	2,0	0,3	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 1,1	0,68	0,15	8,09	8,19	3,0	5,0

*Contagem < 1 x 10⁰ UFC/mL

QUADRO 2. Resultados de análises de água do *chiller*.

Análise	Mesófilos		Coliformes a 35°C		<i>E. coli</i>		CRL (mg/L)		pH		T (°C)	
	(log ₁₀ UFC/mL)		(log ₁₀ NMP/mL)		(log ₁₀ NMP/mL)							
	8h	16h	8h	16h	8h	16h	8h	16h	8h	16h	8h	16h
1	3,32	3,68	3,34	4,21	3,04	4,21	0,0	0,0	6,30	6,80	0,6	0,5
2	2,70	3,00	4,08	4,08	4,08	3,96	0,0	0,0	6,95	6,96	1,9	2,1
3	3,56	3,66	4,08	3,96	4,08	3,71	0,0	0,0	6,99	7,11	0,2	1,6
4	3,61	3,77	4,08	4,36	3,96	4,36	0,0	0,0	6,98	7,03	0,7	1,1
5	4,57	4,62	4,08	3,84	4,08	3,84	0,0	0,0	6,81	6,98	1,6	1,6
6	3,08	3,20	4,36	4,21	4,36	4,21	0,0	0,0	6,78	7,14	0,7	1,1
7	3,58	3,60	3,96	4,08	3,71	4,08	0,0	0,0	7,69	7,04	1,3	0,9
8	3,72	3,83	4,36	3,84	4,21	3,34	0,0	0,0	7,25	7,31	1,8	0,5
9	3,66	3,69	3,84	4,36	3,56	4,36	0,59	0,0	7,59	7,71	1,8	3,5
10	3,86	3,59	4,08	4,36	3,04	4,21	0,0	0,0	7,70	7,83	0,6	1,9
11	3,45	3,45	4,36	4,36	4,36	4,36	0,0	0,0	7,84	7,48	2,0	2,1
12	3,63	3,81	4,36	4,21	3,71	3,71	0,0	0,0	7,28	7,27	2,0	2,1
13	3,52	3,38	4,21	4,21	3,96	3,96	0,0	0,0	7,48	7,57	2,8	2,1
14	3,56	3,71	4,36	4,36	4,36	4,36	0,0	0,0	7,31	7,52	0,8	0,8
15	3,66	3,63	3,71	4,36	3,56	4,36	0,0	0,0	7,47	7,49	2,7	3,5
16	3,63	3,75	3,96	4,36	3,96	4,21	0,0	0,0	7,72	7,61	1,7	2,4
17	3,75	3,89	4,21	4,36	4,08	4,36	0,0	0,0	7,58	7,48	0,1	1,7
18	3,96	3,74	4,21	4,36	4,08	4,08	0,0	0,0	7,25	7,30	0,8	0,7

QUADRO 3. Resultados de contagem de aeróbios mesófilos em carcaças.

Análise	Mesófilos (\log_{10} UFC/g)			
	8h		16h	
	antes	depois	antes	depois
1	7,63	5,15	7,00	4,34
2	7,49	6,15	7,23	3,90
3	5,30	4,73	6,94	4,52
4	7,57	5,34	7,26	5,11
5	6,30	5,26	6,87	4,76
6	5,85	4,87	5,60	4,36
7	6,72	4,70	5,70	4,38
8	5,48	4,92	6,26	5,41
9	5,85	4,71	6,08	4,70
10	5,48	4,92	5,70	4,70
11	5,48	4,62	6,04	4,71
12	5,40	5,54	5,36	4,97
13	5,63	5,20	5,53	4,93
14	4,70	4,91	6,15	5,10
15	5,59	5,56	5,93	5,09
16	5,77	4,51	5,48	5,80
17	4,90	4,72	6,03	5,05
18	5,23	4,63	5,86	4,76

QUADRO 4. Resultados de contagem de Enterobacteriaceae em carcaças.

Análise	Enterobacteriaceae (log ₁₀ UFC/g)			
	8h		16h	
	antes	depois	antes	depois
1	4,87	3,11	5,77	2,53
2	6,04	2,43	4,30	2,30
3	5,00	3,08	5,60	2,79
4	6,76	3,72	5,53	3,68
5	6,77	3,32	5,70	2,95
6	4,60	3,45	4,30	2,30
7	4,48	3,45	4,53	3,20
8	3,30	3,08	3,85	3,61
9	3,95	3,63	4,26	3,43
10	3,90	3,76	3,81	3,70
11	3,85	3,45	4,28	3,15
12	3,90	3,30	3,70	2,90
13	5,73	3,38	4,91	3,93
14	3,78	3,60	5,00	4,10
15	3,95	3,58	4,00	2,70
16	3,00	3,46	4,11	4,08
17	3,30	2,70	4,93	3,67
18	3,60	3,36	4,45	3,45

QUADRO 5. Resultados de contagem de coliformes a 35 °C em carcaças.

Análise	Coliformes a 35 °C (log ₁₀ UFC/g)			
	8h		16h	
	antes	depois	antes	depois
1	5,81	3,00	4,59	2,11
2	6,60	4,65	3,70	2,04
3	6,78	5,00	2,70	2,60
4	6,20	3,43	4,18	2,96
5	5,83	2,30	3,90	2,60
6	4,85	3,13	3,90	2,62
7	4,85	3,12	3,90	2,60
8	4,65	2,48	3,48	2,60
9	3,67	3,36	3,72	3,28
10	3,56	2,78	3,63	3,91
11	3,82	3,00	4,02	2,00
12	3,85	2,90	3,64	2,30
13	2,70	2,95	4,40	3,90
14	3,41	3,08	4,09	3,73
15	3,80	3,54	4,12	2,48
16	3,57	3,08	3,18	3,74
17	2,95	2,00	4,03	3,18
18	3,18	2,00	3,52	2,48

QUADRO 6. Resultados de contagem de *E. coli* em carcaças.

Análise	<i>E. coli</i> (log ₁₀ UFC/g)			
	8h		16h	
	antes	depois	antes	depois
1	5,34	2,48	4,00	1,78
2	6,30	4,32	3,00	1,78
3	5,26	2,30	3,30	2,30
4	5,90	2,70	3,60	2,28
5	5,08	2,00	3,70	2,48
6	4,48	3,00	3,30	2,36
7	5,08	2,11	3,60	2,38
8	5,04	2,00	*	*
9	3,23	2,78	3,38	2,00
10	3,41	2,60	3,28	3,73
11	3,36	2,60	3,23	*
12	3,59	2,60	3,46	2,00
13	2,00	2,78	4,14	3,34
14	3,11	3,04	3,63	3,26
15	3,40	3,48	3,85	*
16	3,11	2,95	3,11	3,18
17	2,48	2,00	3,81	2,48
18	3,11	2,00	2,95	*

* Contagem < 1 x 10⁰ UFC/g