

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO
MESTRADO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO

RENATA LOUIZE SAMULAK

MONITORAMENTO VIA PCR DE *Salmonella spp.* NO
PROCESSAMENTO DE CARNE SUÍNA

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2013

RENATA LOUIZE SAMULAK

**MONITORAMENTO VIA PCR DE *Salmonella spp.* NO
PROCESSAMENTO DE CARNE SUÍNA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção, do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Produção da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dr. Juliana Vitória Messias Bittencourt

Co-orientadora: Prof. Dr. Sabrina Ávila Rodrigues

PONTA GROSSA

2013

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa
n.14/13

S193 Samulak, Renata Louize

Monitoramento via PCR de Salmonella spp. no processamento de carne suína. /
Renata Louize Samulak. -- Ponta Grossa: 2013.
65 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt
Co-orientadora: Profa. Dra. Sabrina Ávila Rodrigues

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Tecnológica Federal do
Paraná. Ponta Grossa, 2013.

1. Carne de porco - Indústria. 2. Alimentos de origem animal - Contaminação. 3.
Salmonela. 4. Reação em cadeia de polimerase. 5. Alimentos - Manuseio - Medidas
de segurança I. Bittencourt, Juliana Vitória Messias. II. Rodrigues, Sabrina Ávila. III.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa. IV. Título.

CDD 670.42



Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PRODUÇÃO



FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação Nº 217/2013

MONITORAMENTO VIA PCR DE *Salmonella Spp.* NO PROCESSAMENTO DE CARNE SUÍNA

por

Renata LouizeSamulak

Esta dissertação foi apresentada às **14 horas e 30 minutos de 20 de fevereiro de 2013** como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, com área de concentração em Gestão Industrial, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo citados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Maike Taís Maziero Montanhini
(UTFPR)

Prof^a. Dr^a. Sabrina Ávila Rodrigues
(UTFPR)

Prof^a. Dr^a. Maria Helene Giovanetti Canteri
(UTFPR)

Prof^a. Dr^a. Juliana Vitoria Messias
Bittencourt (UTFPR) - Orientador

Prof. Dr. João Luiz Kovaleski (UTFPR)
Coordenador do PPGE

A FOLHA DE APROVAÇÃO ASSINADA ENCONTRA-SE NO DEPARTAMENTO DE
REGISTROS ACADÊMICOS DA UTFPR –CÂMPUS PONTA GROSSA

Dedico esta dissertação a minha
família, pelo apoio, amor, compreensão e
paciência.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar coragem a não desistir de um sonho e força, para concretizá-lo.

À Minha orientadora Prof. Dr. Juliana Vitória Messias Bittencourt pela confiança, amizade e pelos ensinamentos adquiridos.

À Professora Dr. Sabrina Ávila Rodrigues pela co-orientação e colaboração para realização dessa dissertação.

À CAPES pelo concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais Renato e Suely pelo carinho, apoio, incentivo nos momentos difíceis e entusiasmo na concretização deste trabalho.

À minha irmã Lilian, que mesmo distante sempre apoiou minhas decisões.

Ao meu namorado Leandro, por me ajudar sempre que precisei, pelo amor, companheirismo e paciência.

As amigas e colegas de mestrado Marjory e Gabriela, pela amizade. Vocês foram uma parte muito importante deste trabalho.

A estagiária do laboratório de Bioengenharia e amiga Andiará, pela disposição e por me ajudar sempre que precisei.

Aos proprietários do frigorífico por permitir a coleta das amostras.

A minha amiga Giovana que sempre me incentivou e ajudou neste trabalho.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

RESUMO

SAMULAK, Renata Louize. **Monitoramento via PCR de *Salmonella spp.* no processamento de carne suína.** 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2013.

A *Salmonella spp.* é um dos principais micro-organismos patogênicos envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's), com destaque para surtos envolvendo a ingestão de carne suína. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a segurança alimentar na produção de carne suína e embutidos quanto a presença de *Salmonella spp.* no processo produtivo. As amostras foram coletadas em um frigorífico que abate suínos e fabrica embutidos, localizado na região dos Campos Gerais - PR. Inicialmente, para padronização da PCR foi necessário determinar um protocolo de extração, bem como, ajustes metodológicos para amplificação de DNA. Para esses testes realizados, foi utilizada amostra de *Salmonella spp.* previamente isolada de alimento. O protocolo de extração testado foi lise térmica e para reação de amplificação foram avaliadas três concentrações de DNA e diferentes temperaturas de hibridização para estabelecimento do padrão ideal. O protocolo escolhido mostrou-se bastante eficiente para extração do DNA de *Salmonella spp.*, pois permitiu a obtenção de DNA em quantidade e com qualidade suficiente para amplificação de bandas. Para a amplificação, a melhor condição encontrada foi a concentração de DNA de aproximadamente 40 ng e uma temperatura de hibridização de 57 °C. Com o intuito de validar a análise molecular via PCR, realizou-se um estudo comparativo inicial com a microbiologia convencional para comprovação dos resultados obtidos pela análise molecular. Inicialmente foram escolhidos dezessete pontos durante as diferentes etapas do processo produtivo do frigorífico em estudo. Duas carcaças foram acompanhadas durante todo o processo e amostras foram coletadas, contemplando desde a etapa de escaldagem até o embutimento do produto final. A utilização da técnica de PCR mostrou-se vantajosa nos seguintes aspectos: tempo de análise total de aproximadamente 30 horas; maior sensibilidade comparado ao método convencional. Decorrida a validação, foi realizada nova coleta, contemplando etapas desde pré-abate até a obtenção do embutido, perfazendo um total de 62 amostras, com intuito de avaliar contaminação durante a produção de carne suína e embutidos. Como resultado, foi verificado que 60% das amostras estavam contaminadas por *Salmonella spp.*, em diversas etapas do processo produtivo. A partir dessa avaliação, foram selecionados alguns pontos contaminados e elaborado um plano de ações corretivas, a fim de controlar e diminuir os perigos microbiológicos existentes no local. Através de novas análises via PCR foi possível verificar que o plano de ações foi eficiente em 100% das amostras.

Palavras-chave: Produção de carne suína. Contaminação. *Salmonella spp.*. PCR. Segurança Alimentar.

ABSTRACT

SAMULAK, Renata Louize. **PCR monitoring of *Salmonella spp.* in pork processing.** 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Federal University of Technology - Ponta Grossa, 2013.

The *Salmonella spp* is major pathogens involved in Food borne Diseases (FBD), especially outbreaks involving the ingestion of meat and this products. The aim of this study was to evaluate the food safety in pork and sausages production for the *Salmonella spp.* presence in the process. The samples were collected in a refrigerator that slaughter pigs and manufactures sausages, located in the Campos Gerais - PR. Initially, to standardize the PCR was necessary to determine an extraction protocol, as well as methodological adjustments to the PCR reaction. For these tests it was used sample of *Salmonella* isolated from food. The extraction protocol was tested by heating process and for amplification reaction were evaluated three different concentration of DNA and hybridization temperatures to establish the ideal standard. The chosen protocol proved to be very efficient for the *Salmonella ssp* DNA extraction because it allowed obtaining DNA in sufficient quality and quantity for amplification bands. For amplification, the best condition was found a concentration of approximately 40 ng DNA and a hybridization temperature of 57 ° C. In order to validate the molecular analysis by PCR, we carried out a comparative study with the initial conventional microbiology for proof of all results obtained by molecular analysis. Seventeen points were chosen during the different stages of production process. Two carcasses were monitored throughout the procedure and samples were collected, comprising the scalding step to the final product inlay. The PCR usage technique proved advantageous in the following aspects: total analysis time of approximately 30 hours; higher sensitivity compared to conventional. After validation, we performed a new collection, covering stages from pre-slaughter until embedded obtaining, making a total of 62 samples, in order to assess contamination during production of pork and sausages. As a result, it was found that 60% of the samples were contaminated with *Salmonella spp*, in various stages of production. From this evaluation, we selected some points contaminated and developed a corrective action plan in order to control and reduce microbiological hazards on the premises. Through further analysis by PCR was possible to verify that the action plan was effective in 100% of samples.

Keywords: Production of pork. Contamination. *Salmonella spp.* PCR. Food Safety.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Consumo de carne suína no Brasil	17
Figura 2 - Fluxograma básico de abate de suínos	21
Figura 3 - Etapas do processo e pontos de amostragem.....	33
Figura 4 - Resultado do ajuste metodológico para PCR de <i>Salmonella spp</i>	37
Figura 5 - Resultados Nested PCR para os 17 pontos amostrados	38
Figura 6 - Resultado da avaliação de pontos de contaminação por <i>Salmonella spp</i>	42
Figura 7 - Resultado da avaliação dos pontos de contaminação por <i>Salmonella spp</i> . na produção de carne suína e embutidos	43
Figura 8 - PPHO para higienização de instalações	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Amostras coletadas para validação do diagnóstico molecular via PCR ..	31
Quadro 2 – Resultados obtidos por PCR <i>versus</i> Nested PCR dos 17 pontos amostrados.....	39
Quadro 3 - Comparação dos resultados entre microbiologia convencional e PCR...	41
Quadro 4 - Resultados da análise de <i>Salmonella spp.</i> via PCR após a aplicação do plano de ações corretivas	52

LISTA DE SIGLAS

ADPT	Água Deionizada Peptonada Tamponada
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BGA	Ágar Verde Brilhante
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTA	Doença transmitida por Alimentos
WHO	World Health Organization
pb	Pares de base
PCR	Polimerase chainreaction
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
ppm	Partes por milhão
PRP	Programa de Redução de Patógenos
SIH	Sistema de Informações Hospitalares
SS	Agar <i>Salmonella- Shigella</i>
Taq	Taq DNA polimerase
TQM	Total Quality Manegement
TSI	Agar Tríplice Açúcar ferro
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VNC	Células viáveis mas não cultiváveis

LISTA DE ACRÔNIMOS

ABIEPCS	Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
FAO	Food and Agriculture Organization
LIA	Ágar Lisina Ferro
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NASA	National Aeronautics and Space Administration
POA	Produtos de Origem Animal
SIP	Serviço de Inspeção do Paraná
SIF	Serviço de Inspeção Federal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 JUSTIFICATIVA.....	14
1.2 OBJETIVOS.....	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2 Objetivos Específicos.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 PANORAMA DE MERCADO DA CARNE SUÍNA (NACIONAL E MUNDIAL)...	17
2.2 COMPOSIÇÃO DA CARNE SUÍNA.....	18
2.3 MICROBIOTA DA CARNE SUÍNA.....	18
2.3.1 <i>Salmonella spp.</i>	19
2.4 PROCESSO DE ABATE E A CONTAMINAÇÃO.....	20
2.5 SEGURANÇA DOS ALIMENTOS.....	22
2.5.1 Programas de Segurança dos Alimentos.....	23
2.5.2 PCR Como Método Analítico Rápido Para Controle Microbiológico Dos Alimentos.....	26
3 METODOLOGIA	28
3.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA.....	28
3.2 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.....	28
3.3 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA ANÁLISE DE <i>Salmonella spp.</i>	28
3.4 COMPARAÇÃO DA ANÁLISE DE <i>Salmonella spp.</i> POR MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL E PCR.....	30
3.4.1 Análise por Microbiologia Convencional.....	31
3.4.2 Análise de Diagnóstico molecular Via PCR.....	32
3.5 AVALIAÇÃO DOS PONTOS DE CONTAMINAÇÃO POR <i>Salmonella spp.</i>	32
3.6 PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS.....	34
3.7 VERIFICAÇÃO DA EFETIVIDADE DO PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1 PADRONIZAÇÃO DAS ETAPAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	36
4.1.1 Definição do Protocolo de extração.....	36
4.1.2 Ajustes metodológicos para amplificação.....	37
4.2 COMPARATIVO ENTRE MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL E ANÁLISE VIA PCR.....	37
4.2.1 Resultados da avaliação microbiológica por PCR para <i>Salmonella spp.</i>	38
4.2.2 Microbiologia Convencional versus Análise via PCR.....	40
4.3 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS PONTOS DE CONTAMINAÇÃO POR <i>Salmonella spp.</i>	42
4.4 PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS.....	47
4.4.1 Treinamento dos Manipuladores.....	47
4.4.2 PPHO para Instalações.....	48

4.5 VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS.....	51
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem ocupado papel de destaque no mercado mundial como importante produtor de alimentos, demonstrando significativo potencial de produção e exportação de alimentos de origem animal, dentre eles a carne suína.

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína (ABIPÉCS), a região sul do Brasil concentra os três maiores produtores de carne suína do país, com o estado do Paraná ocupando o terceiro lugar. Com relação ao mercado externo, de janeiro a abril de 2011, os principais destinos da carne suína brasileira foram a Rússia e a China (ABIPÉCS, 2011).

O aumento da produção de alimentos tem gerado uma preocupação inevitável com a segurança alimentar, uma vez que os alimentos podem ser veiculadores de doenças, representando um risco à saúde pública.

Segundo a WHO (2002), dentre os produtos de origem animal, as carnes ocupam o segundo lugar dos alimentos mais frequentemente envolvidos em (DTA's). Isso ocorre devido a muitos agentes patogênicos pertencerem a microbiota natural dos animais de corte (trato digestório, faringe, tonsilas, narinas, tecido linfático) contaminando as carcaças durante o abate (MATSUBARA, 2005).

Carmo et al. (2005), a partir dos dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) do Ministério da Saúde, verificaram a ocorrência de mais de três milhões de internações em função de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no Brasil, de 1999 a 2004, com uma média de cerca de 570 mil casos diagnosticados por ano. Porém, os casos ocorridos são bem maiores dos que os registrados, visto que a maioria desses casos não chegam a contar nas estatísticas. Grande parte dos doentes não notificam os órgãos de saúde quando ocorre algum tipo de problema de saúde em razão do consumo de alimentos contaminados.

Diante da globalização e da crescente conscientização dos consumidores na busca por alimentos com qualidade, toda cadeia produtiva deve estar preparada para o desafio de produzir alimentos seguros, com excelência em qualidade (BEZZERA e MARTINS, 2008).

Partindo desse contexto, certos países como Estados Unidos e União Europeia passaram a exigir medidas mais rigorosas de controle de inocuidade de alimentos para garantir a segurança alimentar dos produtos por eles importados. Com o crescimento das exportações, existe uma maior preocupação das empresas

em fornecer carne com qualidade microbiológica compatível com as exigências do mercado externo, aumentando assim a competitividade.

Além disso, os consumidores do mercado nacional estão se tornando mais exigentes quanto à qualidade do alimento adquirido. Para atender as expectativas desse público, tanto interno quanto externo, com a produção de um alimento seguro, existe a necessidade de melhoria contínua no gerenciamento da segurança alimentar na produção da carne suína e derivados embutidos. Nesse sentido questiona-se:

Como diminuir a contaminação microbiológica na produção de carne suína e derivados embutidos?

A presente pesquisa parte do pressuposto de que existem micro-organismos patogênicos de origens distintas, causadores de contaminação nas etapas da produção de carne suína e fabricação de embutidos. Para um melhor controle dessa contaminação a pesquisa busca identificar os pontos críticos para que a medida de controle seja mais efetiva, melhorando assim a segurança alimentar.

1.1 JUSTIFICATIVA

Para garantir que a carne produzida apresente uma qualidade microbiológica assegurada, as empresas vêm buscando a implantação de programas de segurança alimentar que visam a inocuidade do alimento por meio de medidas higiênic-sanitárias e de controle de processo.

Dentre os programas mais utilizados estão as Boas Práticas de Fabricação, os procedimentos padrão de higiene Operacional e o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

O sistema APPCC é considerado o melhor programa de planejamento de controle de perigos microbiológicos em alimentos, desde a obtenção da matéria-prima até o produto final, e é composto de sete princípios: analisar perigos e riscos; determinar pontos críticos de controle; definir os limites críticos; monitoramento; ações corretivas; verificação da efetividade das ações e arquivamento de registros (ICMSF, 1997).

Porém, uma das limitações do sistema está associada à identificação e monitoramento das etapas críticas, inadequadas, levando à ineficiência do sistema.

A intenção do presente estudo é utilizar-se de alguns princípios desse sistema propondo a aplicação do método de diagnóstico molecular para avaliar os pontos críticos de contaminação no processamento de carne suína e embutidos.

O diagnóstico molecular já vem sendo utilizado por empresas de grande porte no controle de qualidade do produto, por apresentar resultados rápidos e eficientes. Porém, esse método não é reconhecido pelos órgãos regulamentadores como uma técnica oficial. Para que a legislação reconheça esse método, é necessário que a ciência, através de pesquisas, como o presente estudo, ofereça subsídios técnicos favoráveis.

Nesse sentido, existem diversos estudos no Brasil sobre a utilização do diagnóstico molecular em substituição às análises convencionais. Von Rückert (2006) obteve resultados positivos quando comparou métodos convencionais com diagnóstico molecular no monitoramento de *Salmonella spp.* em frangos durante o abate em frigorífico na região de Minas Gerais. Teodoro et al. (2006); Pelisser et al. (2009); Mürmann et al. (2009); Germinni et al.(2009); Freitas (2008) entre outros autores utilizaram essa técnica para determinação de micro-organismos patogênicos em carnes e produtos derivados.

Dessa forma, o presente estudo faz-se relevante, pois, visa validar a utilização do diagnóstico molecular como método de análise para avaliar a segurança alimentar na produção de carne suína e embutidos quanto a presença de *Salmonella spp.* no processo produtivo, e a partir dos resultados propor medidas de gestão e controle mais efetivas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a segurança alimentar na produção de carne suína e embutidos quanto à presença de *Salmonella spp.* no processo produtivo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Validar o diagnóstico molecular via PCR para identificação de pontos de contaminação nas etapas de abate à fabricação de embutidos.
- Comparar o diagnóstico molecular via PCR com Microbiologia Convencional.
- Identificar pontos de contaminação por *Salmonella spp.* na produção de carne suína e embutidos via PCR.
- Aplicar um plano de ações corretivas em pontos críticos de contaminação por *Salmonella spp.*
- Verificar a eficiência do plano de ação proposto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PANORAMA DE MERCADO DA CARNE SUÍNA (NACIONAL E MUNDIAL)

A carne suína é a fonte de proteína animal mais importante no mundo, com a produção de 100 milhões de toneladas. O Brasil é o quarto produtor e exportador mundial de carne suína com 3% da produção e 11% das exportações, ficando atrás apenas da China, União Europeia e Estados Unidos (ABIPECS, 2010).

Segundo a Associação Brasileira de Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína, em 2011, o Brasil produziu cerca de 3,4 milhões de toneladas de carne suína. Com relação ao mercado interno brasileiro, nos últimos anos encontra-se em processo de fortalecimento. O consumo per capita passou de 13,4 Kg para 15,1 Kg em 2011. De acordo com dados do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (SIF/MAPA, 2011) a preferência dos consumidores tem-se concentrado nos produtos frescos (linguiças) e nos pratos prontos, conforme Figura 1. Já, a demanda por cortes temperados e *in natura* tem sido relativamente pequena, muito embora o consumo de produtos suínos salgados ainda represente a minoria.

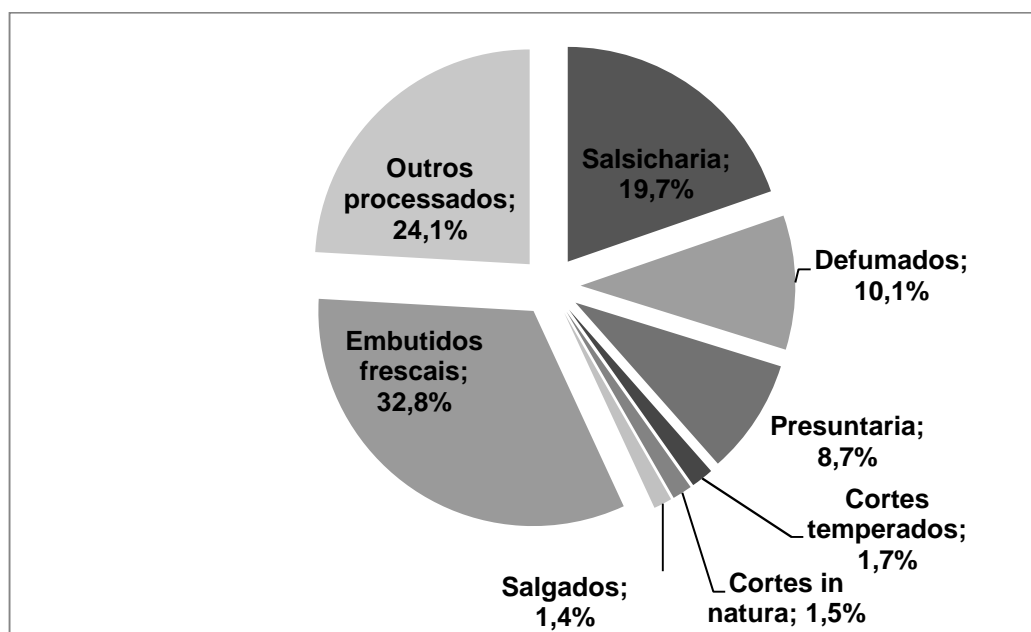


Figura 1 - Consumo de carne suína no Brasil
Fonte: MAPA (2010)

2.2 COMPOSIÇÃO DA CARNE SUÍNA

A carne suína, assim como as outras carnes, apresenta alta atividade de água, associada a sua composição química complexa (água 75%, proteínas 19%, carboidratos 1,2%, compostos nitrogenados solúveis 1,6%, compostos inorgânicos 0,6% e vitaminas) sendo suscetível à proliferação de micro-organismos, tanto deteriorantes quanto patogênicos (FRAZIER e WETOFF, 1993).

2.3 MICROBIOTA DA CARNE SUÍNA

Para Lima e Sousa (2002), a microbiota de um alimento é composta por micro-organismos associados à matéria prima e por contaminantes adquiridos durante etapas de processamento, através da água, das instalações ou equipamentos. Um alimento está sujeito à contaminação de diversas origens. Porém, é possível realizar um controle para manter a microbiota em um número aceitável que não cause problemas de saúde pública.

Para Marra (2009), a carne serve como substrato para a multiplicação de micro-organismos, devido seu alto valor biológico e sua composição química. As etapas anteriores à sua comercialização, quando realizadas inadequadamente, podem se transformar em fontes de contaminação, comprometendo a qualidade do produto final.

Assim, os produtos de origem animal possuem uma variedade de micro-organismos presentes naturalmente ou adquiridos durante o abate. Alguns podem se multiplicar na carne causando deterioração e redução da vida de prateleira. Outros, representam um perigo à saúde dos consumidores por serem causas de intoxicações, doenças infecciosas ou toxinfeciosas (ICMSF, 1997; CORTEZ, 2003).

Os animais são os principais geradores de carga microbiana a partir do conteúdo gastrointestinal, pele, pelos, região orofaríngea. Como esses micro-organismos sobrevivem bastante tempo no ambiente, os suínos portadores constituem uma fonte de infecção, tanto para animais quanto para o homem. (MARTINS et al. 2004; BORCH et al. 1996).

Estudos revelaram presença de agentes patogênicos como *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolítica*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria*

monocytogenes na carne suína e em produtos derivados (BORCH et al., 1996; MC MULLEN, 2000; SANTOS et al., 2006; FORSYTHE, 2005). Nesse estudo, será dado enfoque ao micro-organismo patogênico *Salmonella spp.*

2.3.1 *Salmonella spp.*

A *Salmonella spp.* é um dos patógenos com maior envolvimento com doenças de origem alimentar (WHO, 2002). De acordo com Franco e Landgraf (2010), essa bactéria possui pH ótimo para sua multiplicação em torno de 7,0, com valores inibidores superiores a 9,0 e inferiores a 4,5, e temperatura ideal entre 35-37°C. As salmonelas também não toleram concentração de sal superior a 9%.

As doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados por esse patógeno se subdividem em três grupos: febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*; as febres entéricas causadas por *Salmonella paratyphi* e as enterocolites também conhecidas por salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas (FRANCO e LANDGRAF, 2010).

A salmonelose é a doença de maior incidência causada pelo consumo de alimentos infectados por salmonelas. Os sintomas da salmonelose surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão do alimento contaminado, e podem persistir por dois a três dias, são eles: náuseas, vômito, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia (JAY, 2005).

Segundo Jay (2005) pesquisas relatam que em torno de 40.000 casos de salmoneloses ocorrem anualmente nos Estados Unidos e com registro de morte de cerca de 500 pacientes. Na Alemanha, estudos realizados em 2003 verificaram a ocorrência de 63.000 casos de contaminação por salmonelas (ARNOLD et al., 2004).

No Brasil, foram notificados entre os anos de 2000 a 2011 cerca de 1660 surtos alimentares causados por *Salmonella spp.* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Segundo Von Rückert (2006), existem dados diversificados em vários países a respeito de infecções em humanos originadas pelo consumo de alimentos contaminados por *Salmonella spp.* Esse mesmo autor relata o elevado número de notificações de casos de surtos em países desenvolvidos e poucas notificações em países subdesenvolvidos devido as possíveis diferenças na eficiência dos órgãos

oficiais de saúde de cada país com relação a notificação dos surtos alimentares. De acordo com Forsythe (2005), no Brasil estima-se que apenas 10% dos casos de surtos por salmoneloses sejam notificados aos órgãos competentes.

Estudos desenvolvidos para verificar as condições sanitárias de carcaças suínas, bem como, de embutidos derivados de carne suína, identificaram presença de salmonelas em suas amostras (MÜRMAN et al., 2009; VAN DER GAAG et al., 2004; LIMA et al., 2004; DIAS et al., 2008; SPRICIGO et al., 2008 e SEIXAS, et al., 2009)

Para Jay (2005), a contaminação da carne suína por essa bactéria pode ser originada tanto pela contaminação pelo conteúdo fecal presente no trato intestinal desses animais quanto pelos manipuladores de alimentos que não possuem boas práticas de higiene durante as operações de abate e processamento.

Seixas et al. (2009) reforça que para controlar o crescimento de *Salmonella* em suínos é imprescindível identificar os períodos em que o animal é contaminado, os fatores que levam à multiplicação desse patógeno e as condições em que se pode ocorrer contaminação da carne durante o procedimento de abate.

2.4 PROCESSO DE ABATE E A CONTAMINAÇÃO

O abate de suínos, bem como de outras espécies animais, é realizado para obtenção de carne e de seus derivados, destinados ao consumo humano. Esta operação e os demais processos industriais em que a carne é submetida, são regulamentados por uma série de normas sanitárias destinadas a dar segurança alimentar aos consumidores destes produtos. Assim, os estabelecimentos do setor de carne e derivados em situação regular, trabalham com inspeção e fiscalização contínuas dos órgãos responsáveis pela vigilância sanitária (municipais, estaduais ou federais) (ABIPECS, 2010).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o abate de suínos é regulamentado pela Portaria 711, de 01 de novembro de 1995, que estabelece normas técnicas de instalação de equipamentos de abate e industrialização de suínos, além do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 1995; BRASIL, 1980).

O abate de suínos é composto por uma série de etapas, desde a chegada dos animais no abatedouro, conforme Figura 2.

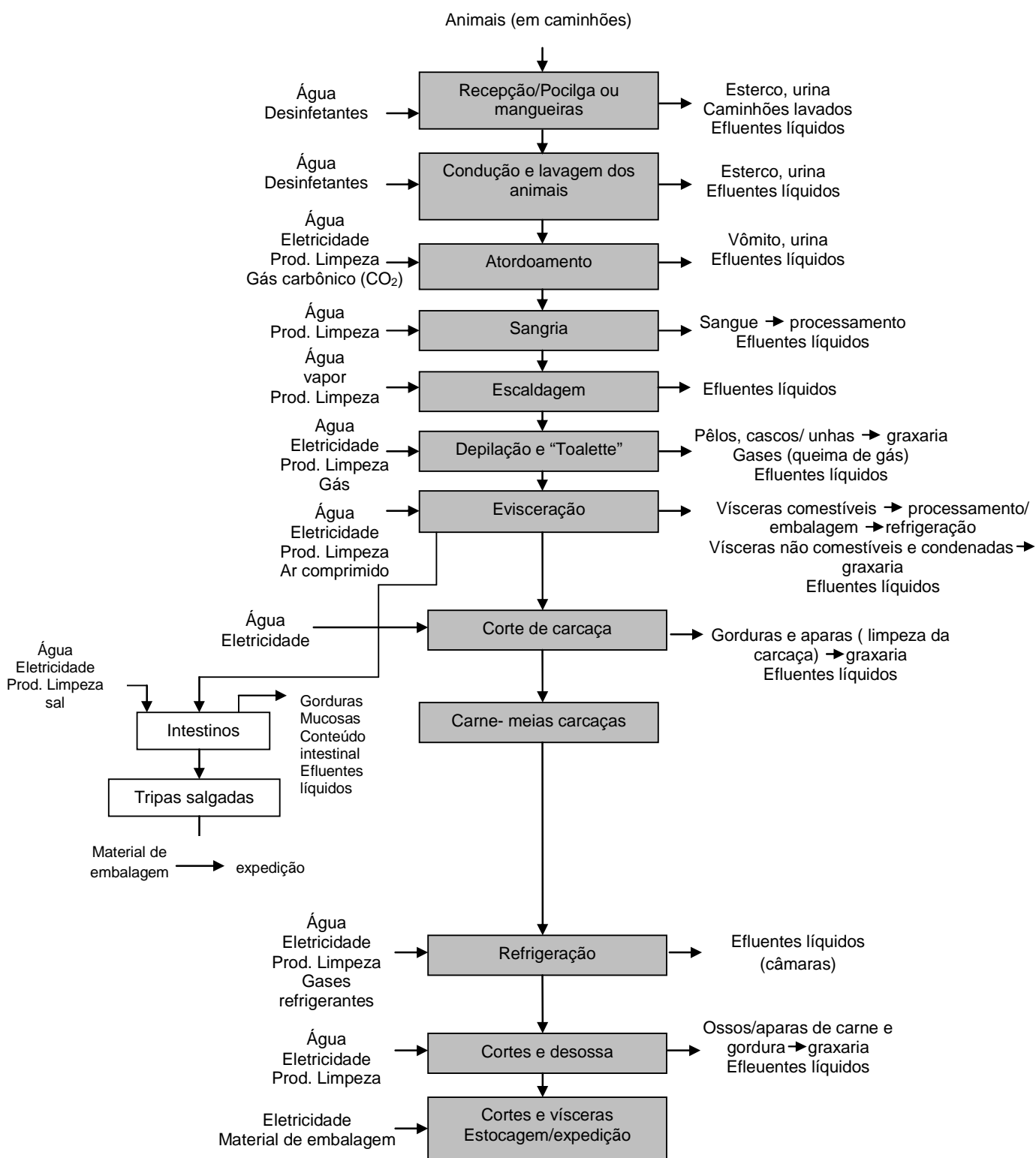


Figura 2 - Fluxograma básico de abate de suínos
Fonte: FIESP (2006)

Durante as diversas etapas do abate de suínos podem ocorrer contaminação, oriundas dos próprios animais, ou por meio de contaminação cruzada pelo ambiente, superfície, equipamentos ou pelo operador.

Matsubara (2005) destaca que a carne e seus derivados estão envolvidos na veiculação de DTA's, pois, os micro-organismos patogênicos estão presentes na microbiota natural dos animais de corte (trato digestório, narinas, faringe, cavidade bucal, tonsilas e tecido linfático) e contaminam as carcaças durante o abate, ou acabam sendo transportados do ambiente contaminado para as mesmas, pelo manipulador, utensílios, equipamentos ou mesmo pela água.

Segundo Borchet al. (1996), o trato digestório dos suínos abriga naturalmente diversos tipos de patógenos e durante o processo de abate podem contaminar partes internas expostas, incluindo-se os músculos, anteriormente considerados estéreis.

De acordo com Berends et al. (1997), 70% da contaminação das carcaças ocorre por meio de animais portadores e 30%, através da contaminação cruzada durante o processo de abate.

Esse mesmo autor destaca ainda que, ao final do abate, a proporção de carcaças contaminadas pode variar de 0 a 100% embora a maioria dos estudos apontarem para média de 30% de contaminação (BERENDS et al., 1997).

Assim, Matsubara (2005) evidencia a necessidade de rigoroso controle das práticas de abate, preconizando a higiene para redução dessa contaminação.

Portanto, para garantir maior segurança dos alimentos é necessária a implantação de programas de controle de qualidade no processamento de carne suína.

2.5 SEGURANÇA DOS ALIMENTOS

Quando se menciona em segurança alimentar ou segurança dos alimentos é possível obter dupla interpretação. A primeira está associada ao termo inglês *Food Security*, que de acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization), é a "segurança de existência de comida suficiente para todas as pessoas, de forma segura e nutritiva". A outra interpretação está relacionada ao termo *Food Safety*, que significa a garantia do consumidor adquirir um alimento com atributos de qualidade,

entre eles os atributos ligados à sua saúde e segurança (SPERS, 2000). Este trabalho tem como enfoque o segundo termo, pois relaciona a segurança dos alimentos com qualidade microbiológica.

Para que um alimento possua qualidade microbiológica assegurada é necessário que sejam tomadas uma série de medidas em toda a cadeia produtiva. Forsythe (2005) relaciona as principais ações como: controle do fornecedor, desenvolvimento do produto e controle do processo, aplicação de boas práticas de higiene durante a produção, processamento (incluindo rotulagem), manuseio, distribuição, estocagem, venda, preparação e uso e integração de programas de qualidade.

De acordo com esse mesmo autor, os testes microbiológicos do produto final, por si só, não garantem a produção de alimentos seguros (FORSYTHE, 2005). Esses testes devem ser realizados como suporte a programas de qualidade. Nesse sentido Jay (2005) reforça a utilização de programas de controle de qualidade que sejam pautados por micro-organismos indicadores de patógenos e bactérias deteriorantes.

2.5.1 Programas de Segurança dos Alimentos

A qualidade microbiológica dos alimentos é um ponto bastante relevante, pois evita doenças transmitidas por alimentos (DTA's). Essas doenças são oriundas de condições higiênico-sanitárias deficientes durante o processamento, a manipulação e o armazenamento de alimentos (GAMARRA, 2007).

Devido às exigências do mercado para a fabricação de alimentos mais seguros e com baixo custo, a maioria das empresas tem percebido as limitações dos programas tradicionais de controle de qualidade na Indústria. Para tanto, se faz necessário implantar sistemas de gerenciamento que permitam produzir, simultaneamente, alimentos efetivamente seguros, com qualidade e com menor custo, a fim de aumentar a competitividade (FRANCO e LANDGRAF, 2010).

Para Matsubara (2005), os programas de segurança alimentar reduzem os riscos de contaminação biológica, química e física, eles abrangem todos os requisitos higiênico-sanitários desde instalações, equipamentos, utensílios, condições da matéria prima, manejo dos animais, requisitos de higiene do ambiente,

do manipulador, potabilidade da água utilizada no processo, controle de pragas, manejo de resíduos e tratamento de efluentes.

De acordo Van Schothorst et al. (2009), durante a última década, houve um aumento no interesse das empresas alimentícias em implantar ferramentas relacionadas aos programas de segurança alimentar com impacto esperado na saúde pública. Segundo esses mesmos autores, na gestão da segurança alimentar, pré-requisitos higiênico-sanitários são exigidos para prevenção ou inibição do crescimento de patógenos.

Para que os programas de qualidade sejam efetivos, são necessárias algumas medidas como: a inspeção dos estabelecimentos para assegurar a efetividade das ações; análises microbiológicas para verificar a presença/ausência de patógenos e toxinas e a capacitação de funcionários para a manipulação de alimentos, pois, eles são os principais veiculadores de micro-organismos indesejáveis nas matérias-primas utilizadas na dieta humana (FORSYTHE 2005; TAVOLARO et.al., 2006).

Devido a gestão da segurança microbiológica dos alimentos ser embasada em controle de toda a cadeia produtiva, desde a recepção até o produto final, existe a necessidade da integração de ferramentas e programas da qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Gerenciamento da Qualidade Total (TQM), Gerenciamento da Qualidade (Série ISO), Programa de Redução de Patógenos (PRP) e o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FORSYTHE, 2005).

Os programas compostos por BPF e PPHO são pré-requisitos para implantação do sistema APPCC. Esses programas levam em consideração aspectos como: estrutura física e manutenção das instalações, adoção de medidas de higiene ambiental e pessoal, controle de qualidade de todo processo através de procedimentos padrão e planilhas de controle, entre outros (CUSATO, 2007).

São inúmeras as vantagens da implantação de programas de BPF e PPHO, dentre elas, podemos enumerar a adequação à legislação vigente, obtenção de alimentos seguros, satisfação do consumidor e redução de gastos com produtos recolhidos do mercado (MICHALCZYSZYN et al., 2008).

O programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é conhecido internacionalmente pela sigla HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points) e teve sua origem na década de 40 pelas indústrias químicas da Grã-

Bretanha. No final dos anos 60 a *National Aeronautics and Space Administration* (NASA), nos Estados Unidos, sugeriu que o sistema fosse utilizado na produção de alimentos para voos espaciais, a fim de minimizar a ocorrência de doenças de origem alimentar. O sistema APPCC foi desenvolvido usando um conceito que combina princípios de microbiologia de alimentos, de controle de qualidade e de avaliação de riscos para produção de um alimento seguro, este sistema tornou-se reconhecido como o método mais eficiente para garantia de qualidade e segurança dos alimentos (FRANCO e LANDGRAF, 2010; HULEBACK e SCHLOSSER, 2002).

A Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas dos Alimentos destaca como consequência da implementação desse sistema nas indústrias, o favorecimento da relação custo/benefício e da economia (ICMSF, 1997).

O sistema APPCC é considerado por Furtini e Abreu (2006) como racional, por basear-se em dados científicos e registrados, lógico e compreensível por considerar ingredientes, processos e usos dos produtos, é contínuo, isto é, os problemas são detectados e imediatamente corrigidos e, sistemático, por ser um plano completo, desde a matéria-prima até a mesa do consumidor.

O APPCC é fundamentado em base científica, na busca de identificar os perigos potenciais que possam aparecer durante as diversas etapas da cadeia produtiva. Esse sistema de segurança alimentar contribui para que as empresas exportadoras apresentem aos seus clientes produtos com qualidade assegurada (OLIVEIRA, 2008).

O TQM é centrado no conceito de melhoria contínua, com a participação de todos os membros da organização enfatizando a garantia da qualidade e objetivos em longo prazo, incluindo além da segurança alimentar, a qualidade e a satisfação do consumidor. As séries ISO 9.000 são compostas por quatro normas internacionais relacionadas com o gerenciamento da qualidade, podem ser usadas como ponto inicial para implantação de programas de TQM e devem ser usadas no gerenciamento do APPCC (FORSYTHE, 2005).

O Programa de Redução de Patógenos visa diminuir o desencadeamento de doenças de origem alimentar. A obrigatoriedade desse programa se aplica aos Estados Unidos e também aos países que exportam para o mercado norte americano. É baseado em quatro componentes: implementação do APPCC; Padrões de desempenho para *Salmonella* com o intuito de verificar o grau de

proteção alcançado pelo sistema APPCC; desenvolvimento e aplicação de PPHO; e provas microbianas para *E. coli* com a finalidade de verificar a suficiência da planta para controlar contaminação fecal, porta de entrada para micro-organismos patogênicos(FIGUEIREDO, 2002).

2.5.2 PCR Como Método Analítico Rápido Para Controle Microbiológico Dos Alimentos

Devido a quantidade de etapas, a análise microbiológica convencional é demorada, além de trabalhosa devido o número de vidrarias e reagentes necessários para sua execução (VON RUCKTER, 2006). Os métodos rápidos como, por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido utilizada para encurtar o tempo entre a coleta de amostra e a obtenção de resultados, o que garante um aumento na segurança alimentar (FORSYTHE, 2005).

A PCR é uma técnica de biologia molecular, criada em 1980 por Kary Millis, constituída por um procedimento *cíclico in vitro* com três passos: desnaturação do alvo, hibridização dos iniciadores e polimerização da sequência alvo (ALVES, 2010). Requer uma DNA polimerase termoestável (Taq DNA polimerase), Mg⁺⁺ como cofator da Taq, desoxirribonucleotídeos (dNTP), iniciadores e um tampão de reação (PERES, 2007).

De acordo com Mullis e Fallona (1987), quando dois oligonucleotídeos iniciadores complementares em relação às extremidades da sequência que se deseja amplificar se hibridizam a uma das fitas de DNA, esta sequência é amplificada a cada ciclo.

Desde sua introdução por Kary Mullis em 1983, a PCR provou ser um método valioso para a detecção de agentes patogênicos em alimentos. É um procedimento rápido com a sensibilidade e especificidade para a detecção rápida e identificação de espécies bactérias patogênicas a partir de fontes diferentes (ALMEIDA e ALMEIDA, 2000)

Dentre as vantagens de se utilizar a PCR como alternativa à microbiologia convencional apontadas por Santos (2003), Maldonado (2008) e Von Ruckter (2006), estão a simplicidade da técnica, menor custo da análise, maior sensibilidade, especificidade e rapidez.

Portanto, a PCR pode ser uma alternativa interessante na melhoria do controle de contaminação de patógenos na indústria de alimentos e conseqüentemente, um avanço na segurança alimentar do produto final.

3 METODOLOGIA

3.1 CLASSIFICAÇÃO DA PESQUISA

A presente pesquisa é classificada do ponto de vista de sua natureza como aplicada, com o objetivo de gerar conhecimentos para aplicação prática e dirigida à solução de problemas específicos (SILVA e MENEZES, 2005).

Levando em consideração o problema de pesquisa, podemos classificá-la como quantitativa e qualitativa, visto que traduz em números as opiniões e informações para classificá-las e analisá-las, mas, também os dados obtidos foram analisados indutivamente.

No que diz respeito aos objetivos, pode ser classificada como explicativa. Visa identificar os fatores que determinam ou contribuem para a ocorrência dos fenômenos. Quanto aos procedimentos técnicos, no caso desse estudo, trata-se de uma pesquisa experimental, pois foi determinado um objeto de estudo, as variáveis capazes de influenciá-lo foram selecionadas e as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto foram definidas (GIL, 1991).

O método científico utilizado foi o do tipo indutivo, que parte de dados particulares para obtenção de uma verdade geral não contida nas partes examinadas (LAKATOS e MARCONI, 2005).

3.2 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada em um frigorífico de suínos e fábrica de embutidos que atua sob o Serviço de Inspeção do Paraná, para Produtos de Origem Animal SIP/POA. A empresa localizada na região dos Campos Gerais, Paraná, possui capacidade de abate média diária de 400 suínos/dia e produção diária de embutidos correspondente a 1,5 toneladas.

3.3 PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA ANÁLISE DE *Salmonella spp.*

Os ajustes metodológicos da técnica foram realizados por meio de testes utilizando amostra de *Salmonella spp.*, previamente identificada, isolada de alimento,

mais especificamente de embutido de carne suína e ressuspensa em 9 mL de caldo ADPT 0,1% e incubada em estufa à 37 °C por 24 horas.

Para extração do DNA testou-se o protocolo de extração por lise térmica ou choque térmico adaptado de Chapman et al.,(2001). O protocolo consistiu em: centrifugação (5.000 rpm por 10 minutos), com descarte posterior do sobrenadante. O pellet foi ressuspensa em 1mL de água miliQ, homogeneizado, centrifugado (12.000 rpm por 3 minutos), sendo o sobrenadante novamente descartado. O pellet foi ressuspensa em 0,2mL de água miliQ e então homogeneizado e aquecido a 95 °C por 20 minutos. Após esse período os tubos foram congelados a – 20 °C por 30 minutos. Em seguida, aquecidos a 65 °C por 1 minuto. Os tubos foram novamente centrifugados (12.000 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi transferido para um novo tubo *ependorf* e mantido a -20 °C até o momento do uso.

Na amplificação do DNA foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *InvA*, sendo *InvA (forward)* 5'- GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GCG CAA 3` e *InvA (reverse)* 5'- TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3`. Os primers *InvA*, amplificam um fragmento de 457 pares de base e são específicos para bactérias do gênero *Salmonella* (GALAN et al., 1992).

A reação de PCR foi realizada em termociclador, como descrito por Maldonado (2008): adicionou-se 2 µL de DNA bacteriano a uma mistura contendo 0,75µL de cada oligonucleotídeo (10µM), 1,5µL de tampão de PCR (500mM), 0,5 µL de MgCl₂ (25mM), 0,5µL de DNtp's (10 mM), 1,5U de taq polimerase, completando com água miliQ para um total de 15 µL.

Foram realizados testes com três concentrações aproximadas de DNA (800ng, 80ng e 40ng). As concentrações foram determinadas utilizando método de comparação com o marcador de peso molecular. Também foram testadas diferentes temperaturas de hibridização para estabelecimento do padrão ideal.

As condições de amplificação foram: 5 minutos a 93 °C, 35 ciclos de 1 minuto a 93 °C, 30 segundos a um gradiente de temperatura de hibridização entre 53,1 °C e 58,1 °C , 1 minuto a 72 °C e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados com brometo de etídio e fotodocumentados em transiluminador ultravioleta para a visualização das bandas.

No caso da ocorrência de bandas pouco visíveis, foi realizada a técnica chamada de *Nested* PCR. Essa técnica consiste em utilizar como DNA alvo o produto da primeira PCR, a fim de intensificar a presença ou ausência de uma dada banda diagnóstica (MOLINA e TOBO, 2004).

Para realização dessa técnica, seguiu-se a mesma reação de amplificação de Maldonado (2008), descrita anteriormente, porém foi substituída a quantidade de DNA bacteriano (2 μ L) pela mesma quantidade do produto de amplificação obtido com a primeira PCR.

3.4 COMPARAÇÃO DA ANÁLISE DE *Salmonella spp* .POR MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL E PCR

Com o intuito de validar a análise molecular via PCR como método de análise de *Salmonella* em alimentos, foi estabelecido um comparativo entre microbiologia convencional e PCR, simultaneamente. A microbiologia convencional utilizou os parâmetros descritos e aceitos pela legislação brasileira, já a PCR utilizou os parâmetros descritos em literatura.

Para tanto, a coleta de amostras foi realizada no frigorífico em estudo. Foram escolhidas dezessete amostras durante as diferentes etapas do processo produtivo. Duas carcaças foram acompanhadas durante todo o processo e amostras foram coletadas, contemplando desde a etapa de escaldagem até o embutimento do produto final. Os pontos de coleta de amostras foram escolhidos intencionalmente, a partir de observações visuais durante o processo de abate e fabricação de embutidos. O Quadro 1 detalha as etapas de coleta e as respectivas amostras coletadas.

Etapa coletada	Amostras
Escaldagem	Swab da Carcaça 1 pós escalda (região lombar)
	Swab da Carcaça 2 pós escalda (região lombar)
	Água do tanque de escaldagem
Evisceração	Swab da Carcaça 1 pós evisceração(cavidade abdominal)
	Swab da Carcaça 2 pós evisceração(cavidade abdominal)
	Swab de Faca de evisceração
	Swab de Mesa de vísceras

Resfriamento	Swab da Carcaça 1 pós resfriamento (região lombar)
	Swab da Carcaça 2 pós resfriamento (região lombar)
	Swab da Parede da câmara fria
Desossa	Carne das carcaças 1 e 2
	Swab de Mesa de desossa
Preparo de massa	Swab de Mão do manipulador
	Swab de Máquina
	Massa do embutido
Embutimento	Swab de Mão do manipulador
	Embutido (linguiça toscana)

Quadro 1 - Amostras coletadas para validação do diagnóstico molecular via PCR
Fonte: Autoria Própria

Foi utilizada a técnica de esfregação de superfície (*swab*) que consiste na fricção de um cotonete estéril sobre a superfície a ser analisada, no interior de um molde estéril com área de 25 cm², revertendo-se a direção entre as sucessivas passagens (SILVA et al., 1997). Os cotonetes foram então mergulhados em tubos contendo 9 ml de água deionizada peptonada tamponada 0,1% (ADPT). A ADPT foi utilizada como meio para o pré-enriquecimento de *Salmonella spp.*

As amostras de água, carne, massa e de linguiça foram coletadas em frascos estéreis. Todas as amostras foram levadas, sob refrigeração, para o Laboratório de Microbiologia da UTFPR.

As amostras de *swabs* foram imediatamente incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Já as amostras de água, carne, massa, linguiça foram previamente inoculadas em ADPT, na proporção 25g de amostra/225 ml de ADPT, para então serem levadas à estufa com as demais amostras.

3.4.1 Análise por Microbiologia Convencional

Para análise microbiológica convencional foi utilizada a metodologia desenvolvida por Vanderzant e Splittstoesser (1992). As análises foram realizadas no laboratório de Microbiologia da UTFPR. Após o período de incubação, foram transferidas de cada amostra alíquotas de 1mL e 0,2mL respectivamente do caldo pré-enriquecedor para dois tubos de ensaio contendo 9mL de caldo *Rappaport Vassiliadis*, incubados a 35 °C por 24 horas. Do crescimento no meio de

enriquecimento seletivo foram transferidos, com o auxílio de uma alça de sementeira, alíquotas do inóculo para placas contendo os meios, ágar verde brilhante (BGA) e ágar *Salmonella – Shigella* (SS) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Para a confirmação bioquímica, foi feita a transferência das colônias suspeitas com o auxílio de uma agulha de inoculação. Uma porção da massa de células do centro da colônia típica foi removida e transferida para os ágars Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e ágar Lisina Ferro (LIA). Os tubos foram incubados a 35 °C por 24 horas para então realizar a leitura dos resultados.

3.4.2 Análise de Diagnóstico molecular Via PCR

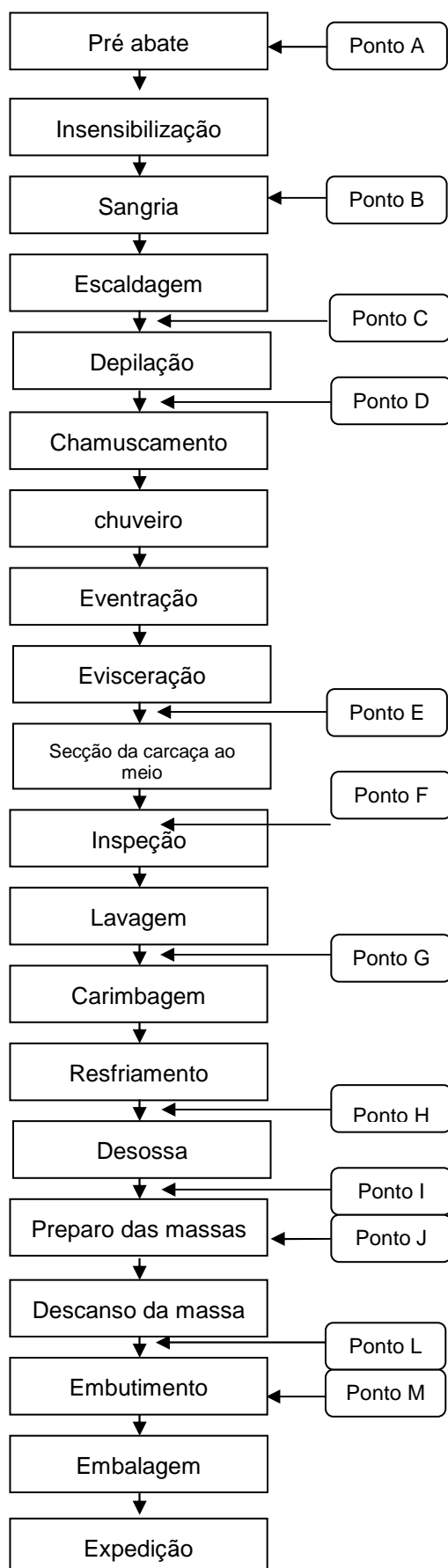
Para análise de diagnóstico molecular via PCR, foram utilizados os inóculos oriundos do cultivo das amostras em caldo de pré-enriquecimento.

Foram transferidas alíquotas de 1,5ml para um tubo *ependorf* para o preparo do DNA bacteriano. Essa análise foi realizada no laboratório de Bioengenharia da UTFPR.

A metodologia de extração do DNA bacteriano utilizada foi o choque térmico ou lise térmica de Chapman et al.,(2001). Para reação da PCR utilizou-se a mesma metodologia descrita no item 3.3, porém utilizando a concentração de DNA e temperatura ideal de hibridização previamente definidas no item 4.1.2 do próximo capítulo.

3.5 AVALIAÇÃO DOS PONTOS DE CONTAMINAÇÃO POR *Salmonella spp.*

Para avaliar os pontos de contaminação durante o processo produtivo, cinco suínos foram acompanhados desde o pré abate até a fabricação de linguiça. Amostras dos animais, do ambiente e de utensílios utilizados nas diversas etapas do processo foram coletadas, totalizando 62 amostras. A Figura 3 mostra o fluxograma de produção bem como, as respectivas amostras coletadas em cada uma das etapas do processo. Assim como no item 3.4, os pontos de coleta foram escolhidos intencionalmente, através observações visuais. Além das dezessete amostras coletadas anteriormente, aumentou-se o número de carcaças amostradas, o número de etapas de processo e a quantidade de amostras por ponto coletado.



Ponto	Amostras	Quant.
A	Swabs dos Couros dos 5 animais vivos	5
B	Swab da Parede do setor	1
C	Amostra de Água do tanque de escalda e swabs das 5 carcaças	6
D	Swabs da depiladeira e das 5 carcaças	6
E	Swabs das 5 Carcaças, da mesa, faca e mãos do manipulador e amostra de água do esterilizador de facas	9
F	Swabs das cinco Carcaças, da serra-fita e amostra de água do esterilizador da serra	7
G	Swabs das 5 Carcaças e amostra de água utilizada na lavagem	6
H	Swabs das 5 Carcaças e da parede da câmara fria	6
I	Swabs de Mesa, faca, mão de manipulador, porta e amostra da carne	5
J	Swab da máquina, mão do manipulador, carrinho de massas e amostra da massa	4
L	Swab da parede da câmara fria e amostra da massa	2
M	Swabs da mesa, embutideira, mão do manipulador, amostra de água das tripas e de linguiça	5
TOTAL		62

Figura 3 - Etapas do processo e pontos de amostragem.

Fonte: Autoria Própria

Para coleta das amostras, seguiu-se o procedimento descrito no item 3.4. Os *swabs* foram mergulhados em tubos contendo 9ml de solução de ADPT. As amostras de água, coletadas em diversas etapas do processo, carne, massa e de linguiça foram armazenadas em frascos estéreis. Todas as amostras foram levadas sob refrigeração, para o Laboratório de Microbiologia da UTFPR.

As amostras de *swabs* foram imediatamente incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. As demais amostras foram previamente inoculadas em ADPT (25g de amostra/ 225 ml de ADPT), para então serem levadas à estufa.

A análise de *Salmonella spp.* foi realizada utilizando a técnica de PCR conforme descrito anteriormente no item 3.4.2.

Os resultados obtidos foram avaliados e os pontos críticos de contaminação foram delimitados.

3.6 PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS

A partir da avaliação dos pontos de contaminação no frigorífico em estudo, foram selecionados alguns pontos críticos e elaborado um plano de ações corretivas, a fim de controlar e diminuir os perigos microbiológicos existentes no local.

O plano de ações corretivas foi embasado em ferramentas e programas de gestão da qualidade e segurança alimentar. Entre eles estão as Boas Práticas de Fabricação, Procedimentos de Higiene Operacional e o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle.

O plano consistiu em duas ações principais: treinamento de funcionários com relação às Boas Práticas de Fabricação e implantação de um novo PPHO para higiene das instalações frigoríficas, visto que a empresa já possuía manual de BPF, bem como, PPHO's.

3.7 VERIFICAÇÃO DA EFETIVIDADE DO PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS

Para a verificação da eficiência das ações empregadas foi realizada uma nova coleta, especificamente nos pontos onde as ações foram implementadas e

uma nova análise de *Salmonella spp.* foi realizada. Foram cinco pontos selecionados: parede da área de sangria, parede da câmara fria de resfriamento de carcaças, parede da câmara fria de descanso de massas e mãos de manipuladores da desossa e do embutimento.

A coleta foi efetuada após um mês de implantação do plano de ação. Utilizou-se a técnica do *Swab* descrita no item 3.4 e a análise de *Salmonella spp* foi feita através técnica de PCR, conforme descrito no item 3.4.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 PADRONIZAÇÃO DAS ETAPAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

A definição de um protocolo de extração, bem como, ajustes metodológicos para reação de PCR, constou de etapas preponderantes para a padronização da metodologia de PCR para análise de *Salmonella spp.* no processo de produção de carne suína e embutidos.

4.1.1 Definição do Protocolo de extração

O protocolo de extração por lise térmica mostrou-se bastante eficiente para extração do DNA de *Salmonella spp.*, pois permitiu a obtenção de DNA em quantidade e com qualidade suficiente para amplificação de bandas.

Estudos realizados anteriormente, como o trabalho de Peres (2007) compararam dois métodos de extração: fenol clorofórmio e lise térmica. A extração por fenol e clorofórmio resultou em DNA em quantidade e qualidade superior, comparado com o DNA extraído por lise térmica. Entretanto, com os dois protocolos de extração houve a amplificação de bandas específicas e nítidas, sem perda de qualidade coma utilização do método de lise térmica e sem os problemas inerentes a utilização de fenol clorofórmio.

Garcia et al. (2008), também compararam os mesmos métodos que Peres (2007) e optaram por utilizar o método por lise térmica pra extração de DNA de *Escherichia coli* O157:H7 devido sua simplicidade e rapidez, uma vez que ambos os métodos de extração de DNA permitiram amplificação dos fragmentos específicos.

Este protocolo foi escolhido para ser utilizado devido a rapidez, (cerca de uma hora para obtenção do DNA bacteriano) e pelo baixo custo operacional, pois, não utiliza reagentes com alto custo, características que contribuem para a velocidade de resultado de um diagnóstico molecular.

Segundo Peres (2007) além da rapidez e da economia, a extração por lise térmica oferece menor risco ao manipulador por não utilizar reagentes tóxicos e conseqüentemente menor impacto ao meio ambiente.

4.1.2 Ajustes metodológicos para amplificação

Foi realizado um teste preliminar para ajustar as condições para amplificação no qual testaram-se duas variáveis: a concentração do DNA e a temperatura de hibridização para reação de PCR. A melhor condição encontrada foi a concentração de aproximadamente 40ng de DNA e uma temperatura de anelamento perto de 57°C (Figura 4). Essa condição ficou estabelecida como padrão para as análises subsequentes.

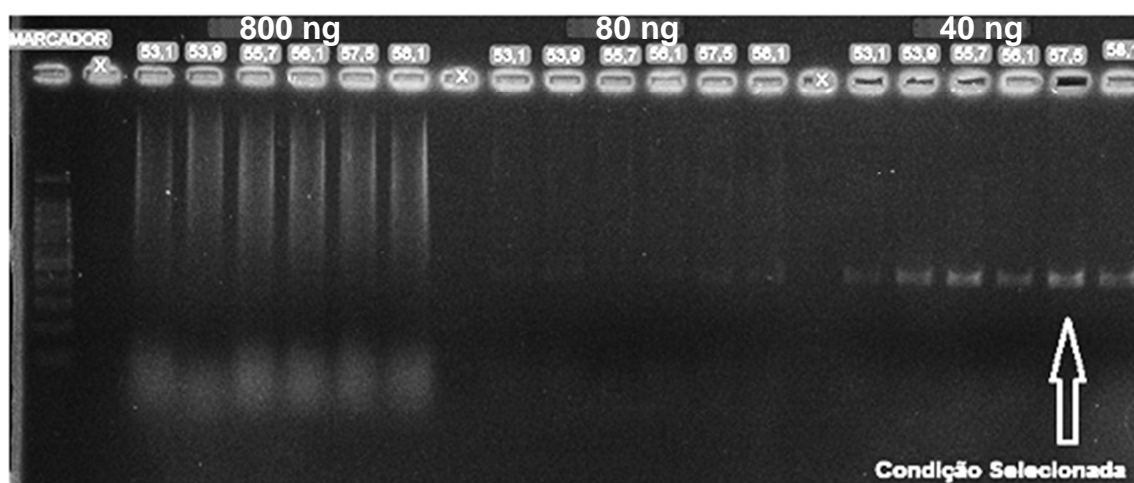


Figura 4 - Resultado do ajuste metodológico para PCR de *Salmonella* spp
 Fonte: autoria própria.

Na literatura, são citadas diversas temperaturas de hibridização utilizadas para amplificação do gene de *Salmonella* spp. Von Ruckert (2006); Matias (2008); Maldonado (2008); Ferreira (2011); entre outros utilizaram a temperatura de 60 °C. Andreatti Filho (2011) utilizou a temperatura de 58 °C. Porém, Freitas (2008) obteve resultado satisfatório ao usar temperatura de 57 °C para etapa de hibridização.

4.2 COMPARATIVO ENTRE MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL E ANÁLISE VIA PCR

A análise molecular via PCR foi realizada paralelamente aos testes microbiológicos convencionais. A seguir estão demonstrados os resultados comparativos entre os testes.

4.2.1 Resultados da avaliação microbiológica por PCR para *Salmonella spp.*

Os resultados dos produtos de amplificação são rotineiramente visualizados em gel de agarose 2%. O resultado positivo para *Salmonella spp.* indica a presença de uma banda (amplificação do DNA) com 457 pares de base, de acordo com o iniciador utilizado (GALAN et al., 1992), comparadas ao marcador de peso molecular (100 pb).

Quando tabulados os resultados para os 17 pontos amostrados, não houve ocorrência de salmonela apenas para carcaças 1 e 2 após escalda, água do tanque de escaldagem, carcaças 1 e 2 após a evisceração, mesa de vísceras, parede de câmara fria, mão de manipulador do setor de preparo de massas e mãos do manipulador do setor de embutimento, o que representa 53% de ausência do micro-organismo com relação aos pontos analisados. No Quadro 2 está apresentado o conjunto de resultados desta etapa.

Porém, foram observadas bandas pouco visíveis, o que pode acarretar em resultados falsos positivos ou falsos negativos, comprometendo a veracidade da presença do micro-organismo. Para tanto, optou-se pela realização da *Nested PCR* que visa aumentar a sensibilidade e especificidade do método (MOLINA E TOBO, 2004). Assim, o produto da amplificação dos 17 pontos amostrados utilizados para a validação do diagnóstico molecular foram utilizados para realização da *Nested PCR*. A ilustração das bandas obtidas está apresentada na Figura 5.

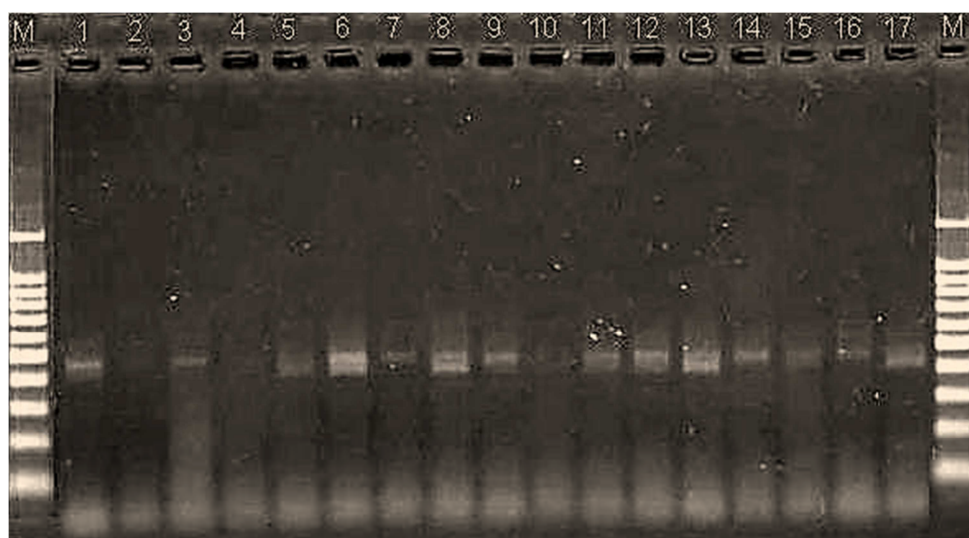


Figura 5 - Resultados Nested PCR para os 17 pontos amostrados
Fonte: autoria própria.

As bandas ficaram mais nítidas, sendo as amostras suspeitas confirmadas e algumas bandas que não foram possíveis de visualizar com a PCR apareceram com a *Nested* PCR, conforme Quadro 2.

Etapa coletada	Cód	Amostras	PCR	<i>Nested</i> PCR
Escaldagem	1	Swab da Carcaça 1 após escalda (região lombar)	Ausência	Presença
	2	Swab da Carcaça 2 pós escalda (região lombar)	Ausência	Ausência
	3	Água do tanque de escaldagem	Ausência	Presença
Evisceração	4	Swab da Carcaça 1 após evisceração(cavidade abdominal)	Ausência	Presença
	5	Swab da Carcaça2 após evisceração (cavidade abdominal)	Ausência	Presença
	6	Swab de Faca de evisceração	Presença	Presença
	7	Swab de Mesa de vísceras	Ausência	Presença
Resfriamento	8	Swab da Carcaça 1 pós resfriamento (região lombar)	Presença	Presença
	9	Swab da Carcaça 2 pós resfriamento (região lombar)	Presença	Presença
	10	Swab da Parede da câmara fria	Ausência	Presença
Desossa	11	Carne das carcaças 1 e 2	Presença	Presença
	12	Swab de Mesa de desossa	Presença	Presença
Preparo de massa	13	Swab de Mão do manipulador	Ausência	Presença
	14	Swab de Máquina	Presença	Presença
	15	Massa do embutido	Presença	Presença
Embutimento	16	Swab de Mão do manipulador	Ausência	Presença
	17	Embutido (linguiça toscana)	Presença	Presença

Quadro 2–Resultados obtidos por PCR versus Nested PCR dos 17 pontos amostrados

Fonte: autoria própria.

A *Nested* PCR foi satisfatória, pois com a PCR 47% das amostras foram positivas para *Salmonella spp.* Com a *Nested* PCR as amostras positivas passaram a ter um percentual 94 pontos, o que representa um aumento de 47 pontos percentuais, como demonstrado em trabalhos de Castagna et al. (2005), confirmando assim, a necessidade dessa etapa de padronização para obtenção de um diagnóstico mais eficiente e verdadeiro.

4.2.2 Microbiologia Convencional versus Análise via PCR

Os resultados obtidos utilizando microbiologia convencional confirmaram a presença de *Salmonella spp.* em quatorze dentre dezessete pontos amostrados, o que representou 82% de presença de *Salmonella* pelo método proposto por legislação. De acordo com as condições em que este trabalho foi desenvolvido, apenas não foi identificada *Salmonella spp.* na carcaça 2 após a escalda, na água do tanque de escalda e na mão do manipulador responsável pela etapa de embutimento.

Para este estudo, a análise por *Nested* PCR mostrou-se mais rigorosa que a microbiologia convencional, sendo mais sensível na detecção da presença de *Salmonella spp.* na produção de carne suína e embutidos. Em função disso foi organizado um quadro comparativo (Quadro 3) com os resultados de ambas as técnicas.

Etapa coletada	Código	Amostras	Microbiologia	<i>Nested</i> PCR
Escaldagem	1	Swab da Carcaça 1 após escalda (região lombar)	Presença	Presença
	2	Swab da Carcaça 2 pós escalda (região lombar)	Ausência	Ausência
	3	Água do tanque de escaldagem	Ausência	Presença
Evisceração	4	Swab da Carcaça 1 após evisceração (cavidade abdominal)	Presença	Presença
	5	Swab da Carcaça 2 após evisceração (cavidade abdominal)	Presença	Presença
	6	Swab de Faca de evisceração	Presença	Presença
	7	Swab de Mesa de vísceras	Presença	Presença
Resfriamento	8	Swab da Carcaça 1 pós resfriamento (região lombar)	Presença	Presença
	9	Swab da Carcaça 2 pós resfriamento (região lombar)	Presença	Presença
	10	Swab da Parede da câmara fria	Presença	Presença

Desossa	11	Carne das carcaças 1 e 2	Presença	Presença
	12	Swab de Mesa de desossa	Presença	Presença
Preparo de massa	13	Swab de Mão do manipulador	Presença	Presença
	14	Swab de Máquina	Presença	Presença
	15	Massa do embutido	Presença	Presença
Embutimento	16	Swab de Mão do manipulador	Ausência	Presença
	17	Embutido (linguiça toscana)	Presença	Presença

Quadro 3 - Comparação dos resultados entre microbiologia convencional e PCR
Fonte: autoria própria.

Por meio da microbiologia convencional foram detectadas 82% de amostras positivas para *Salmonella spp.*. Em contrapartida, pela técnica da *Nested PCR* 94% das amostras estavam contaminadas.

No quadro 3 destacam-se as amostras em que houve diferença de resultados, amostra de água do tanque de escaldagem na etapa de escaldagem e na etapa de embutimento, a mão do manipulador. Ambas foram determinadas negativas para *Salmonella spp* por microbiologia convencional e positivas pela técnica de *Nested PCR*.

A técnica da PCR é capaz de diagnosticar células viáveis mas não cultiváveis (VNC), isto é, um estado dormente assumido por patógenos. Este estado é devido a fatores extrínsecos como: mudanças de temperatura, nível baixo de nutrientes, pressão osmótica, atividade de água e pH, tornando o meio ambiente desfavorável para o crescimento e multiplicação (CASTAGNA, 2005).

Para Maldonado (2008), o fato da PCR detectar VNC justifica o aparecimento de número maior de positivos em relação ao teste microbiológico convencional.

Quando se compara o tempo de duração da análise, a PCR apresenta vantagem por ser uma técnica rápida, com cerca de 30 horas para obtenção do resultado, enquanto a microbiologia convencional pode levar aproximadamente cinco dias.

Outra vantagem da utilização da técnica da PCR está no custo da análise. Santos (2003) comparou o custo das duas análises em dólares não levando em

consideração o custo com implantação do laboratório. O autor verificou que o custo da técnica convencional gira em torno de U\$ 7,38 e a PCR, de U\$ 2,09.

Além disso, para Maldonado (2008), a PCR é válida e útil, desde que padronizadas as condições de cada laboratório. A padronização da técnica foi realizada com sucesso, uma vez que foi possível obter resultados satisfatórios e equivalentes aos alcançados utilizando microbiologia convencional. A partir de então, foi realizada uma avaliação dos pontos de contaminação para verificar a segurança alimentar na produção de carne suína e derivados embutidos.

4.3 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DOS PONTOS DE CONTAMINAÇÃO POR *Salmonella spp.*

A avaliação dos pontos passíveis de contaminação *por Salmonella spp.* na produção de carne suína e embutidos foi realizada através de análise via PCR. Para obtenção desses resultados foram aplicados iguais ajustes metodológicos descritos anteriormente, sendo lise térmica como etapa anterior a PCR. Então, foi feita a primeira amplificação e, posteriormente, a amplificação do produto de PCR (*Nested* PCR). Os resultados da amplificação das 62 amostras coletadas foram visualizados em gel de agarose 2%. A figura 6 traz indicados alguns desses resultados.

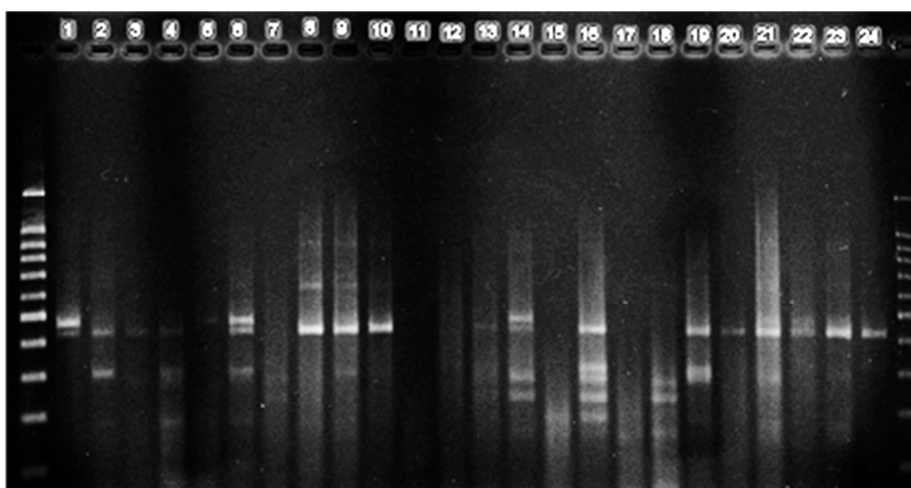
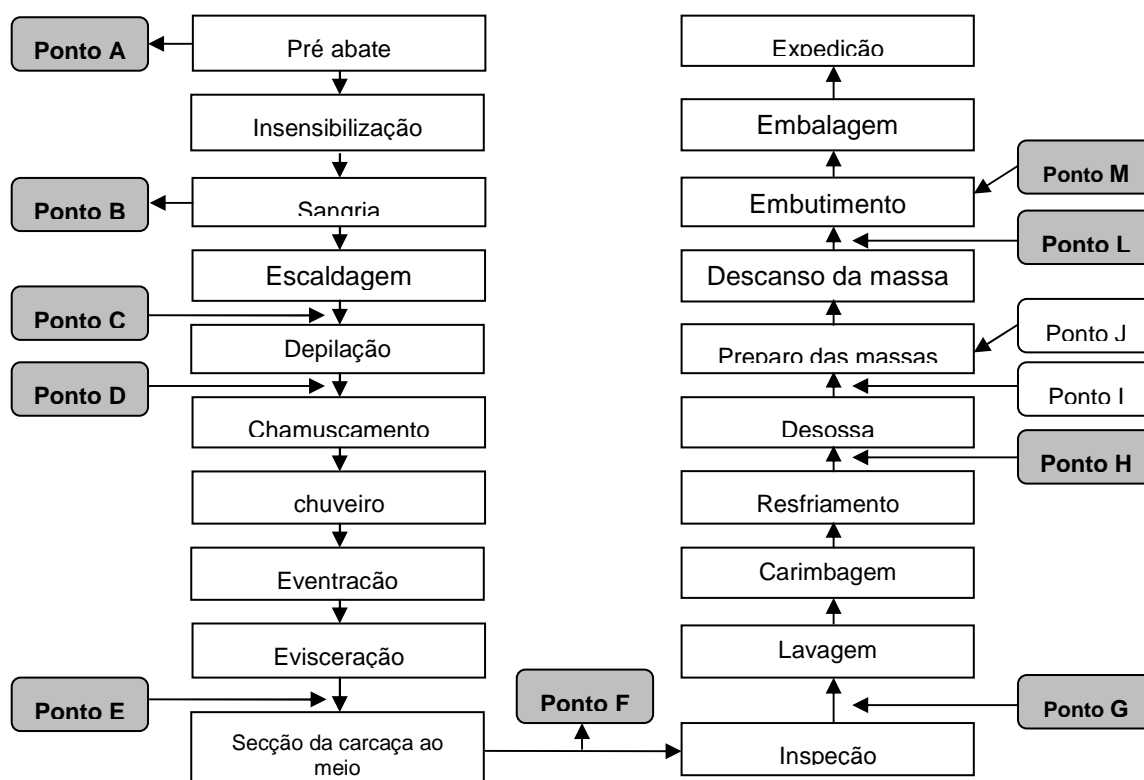


Figura 6 - Resultado da avaliação de pontos de contaminação por *Salmonella spp.*
Fonte: autoria própria.

Dentre as 62 amostras coletadas, 60% apresentaram presença de *Salmonella spp.* Conforme Figura 7. Esse percentual está consideravelmente acima do encontrado por Gamarra (2007), Lima et al. (2004) e Matsubara (2005) que

identificaram em carcaças de suínos durante processo de abate respectivamente 9,3%; 11,7% e 5,42% de *Salmonella spp.* utilizando a microbiologia convencional. Os resultados obtidos com essa pesquisa refletem as fontes de contaminação por *Salmonella spp.*, a eficiência dos procedimentos de higienização e o nível de treinamento dos manipuladores de alimentos.



Ponto	Presença de <i>Salmonella spp.</i>	Quant. de amostras positivas
A	Em todos os 5 animais coletados	5
B	Na parede	1
C	Nas carcaças 2, 3 e 4 após escaldagem	3
D	Nas carcaças 1, 2 e 4 após depilação	3
E	Em todas as 9 amostras coletadas	9
F	Nas carcaças 3, 4 e 5, será fita, água do esterilizador da serra.	5
G	Nas 5 carcaças após lavagem	5
H	Parede da câmara fria	1
I	Zero amostras	0
J	Zero amostras	0
L	Todas as amostras	2
M	Embutideira, mão do manipulador, água utilizada no preparo das tripas	3

Figura 7 - Resultado da avaliação dos pontos de contaminação por *Salmonella spp.* na produção de carne suína e embutidos
Fonte: autoria própria.

Fazendo-se uma análise geral de cada uma das etapas analisadas neste estudo, observou-se que algumas amostras estavam contaminadas desde o pré-abate.

Terra e Fries (2001) verificaram que a carga microbiana presente no couro do animal pode exceder a 10^9 UFC/cm², podendo contaminar a carcaça nas etapas iniciais do abate, por isto a importância da higiene do animal *ante-mortem*.

A operação de escaldagem (Ponto C), que visa reduzir a carga microbiana presente no couro dos animais, foi eficiente apenas para duas das cinco carcaças analisadas.

A água do tanque de escaldagem não apresentou contaminação por *Salmonella spp.*, podendo ser consequência da alta temperatura da água que inibiu o crescimento do micro-organismo. A etapa de escaldagem, quando realizada na temperatura superior a 62°C e no tempo de 6 a 8 minutos, contribui para a redução da carga microbiana da carcaça (GAMARRA, 2007). A realização dessa etapa em temperaturas inferiores a ideal representa um risco de proliferação de micro-organismos. Lima et al.(2004) verificaram a presença de *Salmonella spp* nessa etapa devido à temperatura inadequada do tanque de escalda.

Na etapa de depilação (Ponto D), a carcaça de número 1 estava contaminada após esse processo, porém a depiladeira, na região em que a amostra foi coletada, estava com ausência de *Salmonella spp*. Pode ter ocorrido uma contaminação cruzada proveniente de outra fonte como, por exemplo, o manipulador.

A etapa de depilação é considerada crítica, pois, os micro-organismos presentes no pelo podem contaminar as superfícies expostas da carcaça. Lima et al. (2004) e Thorberg e Engvall (2001) ao avaliarem essa etapa detectaram a presença de micro-organismos fecais como, por exemplo, a *Salmonella spp* e atribuíram ao fato do processo de higienização da depiladeira ser de difícil realização devido a estrutura do equipamento.

Todas as nove amostras coletadas na etapa de evisceração (Ponto E) apresentaram salmonela. A água utilizada para esterilização das facas deveria estar com ausência do micro-organismo devido a temperatura elevada, porém verificou-se que essa barreira não está sendo eficiente, pois a água utilizada para esterilização estava contaminada por *Salmonella spp*.

A evisceração torna-se um perigo quando ocorre extravasamento do conteúdo fecal, difundindo a contaminação. Borchet al. (1996) enfatiza que a contaminação nessa etapa pode ocorrer também através de contaminação oral esofágica. Patógenos de origem fecal como *Escherichia coli*, *Salmonella* também foram encontrados em pesquisas realizadas por Lima et al (2004); Seixas et al (2009); e Thorberg e Engvall (2001).

Outra etapa crítica de contaminação é o Ponto F, correspondente secção da carcaça ao meio. Embora algumas carcaças não apresentassem o micro-organismo, a serra fita e a água de esterilização estavam contaminadas, e com isso pode haver contaminação cruzada das demais carcaças. A inadequada higienização e a falta de treinamento de funcionários no que diz respeito a condutas de boas práticas de fabricação contribuem para que essa etapa se torne um risco à contaminação.

Gamarra (2007) sugere à utilização de serra elétrica com esterilização automática com água a temperatura de 62 °C como uma alternativa para minimizar a carga microbiana.

Para Mantilla et al. (2007), a contaminação durante o abate pode ocorrer também a partir da manipulação da carne por parte dos funcionários, uma vez que esses podem ser portadores sadios de micro-organismos patogênicos como *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter sp.* E *Escherichia coli* enteropatogênica.

O processo de lavagem da carcaça (Ponto G) utilizando água clorada (1,0-1,5 ppm) não interferiu na redução contaminação. A Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas dos Alimentos (ICMSF, 2007) considera a lavagem a jato razoavelmente eficiente para remoção de sujidades visíveis, porém, ineficiente para remoção de contaminação microbiana. Em contrapartida, Gill e Landers (2003), Gamarra (2007) e Saba et al. (2010) obtiveram sucesso na redução da carga microbiana presente na carcaça após a realização da lavagem com jato de água quente sob pressão atmosférica de 3 atm.

Após a lavagem as carcaças são armazenadas em câmara-fria. O resfriamento é considerado um ponto crítico. De acordo com a ICMSF (1997) é necessário reduzir imediatamente a temperatura das carcaças até 7 °C ou menos para minimizar a proliferação de micro-organismos e evitar que se torne um perigo à segurança alimentar. Após o resfriamento (Ponto H), as carcaças não apresentaram o micro-organismo, porém, a parede da câmara-fria estava contaminada conforme a

análise realizada neste trabalho. Tal contaminação pode ser proveniente da formação de biofilmes, processo desencadeado pela superfície mal higienizada. Procedimentos Padrão de Higienização mais rigorosos precisam ser implementados.

Embora, nesse estudo, não tenha sido verificada a presença de *Salmonella spp.* durante o processo de desossa e cortes (Ponto I), nessa etapa pode ocorrer a contaminação cruzada por meio de equipamentos e/ou utensílios utilizados, como facas e bacias mal higienizados que possibilitam a proliferação de micro-organismos. Os manipuladores também podem ser agentes causadores de contaminação por não adotarem práticas de higiene pessoal. O ambiente pode ser um veiculador de micro-organismos, por isso a necessidade de climatizar os setores onde essa etapa é realizada. As normas para produção e exportação de carnes preparadas determina que a temperaturas da sala de desossa deve estar em torno de 10 °C (BRASIL, 1997).

Marra (2009), durante sua pesquisa sobre a dinâmica microbiana na sala de desossa de um frigorífico abatedouro, identificou uma série de micro-organismos indicadores de contaminação, com destaque no patógeno *Escherichia coli* evidenciando a necessidade de medidas de controle efetivas nessa etapa da cadeia produtiva.

Durante o processo de preparo da massa de linguiça frescal (Ponto J) foi constatada ausência de *Salmonella spp.* em todas as amostras analisadas. Porém, após o descanso na câmara-fria (Ponto L), a massa estava contaminada, bem como a parede da câmara fria. Tal fato pode ser associado ao problema de condensação existente no frigorífico estudado. A manutenção das câmaras-frias se faz necessária a fim de evitar os processos de condensação ocasionada pelo fluxo inadequado de ar associado a temperatura e umidade. A condensação favorece a multiplicação de micro-organismos (ICMSF, 1997). Outro fato que pode ser associado é a possibilidade da contaminação cruzada por meio da adição de algum ingrediente contaminado à massa.

Por fim, na etapa de embutimento (Ponto M), embora o equipamento, a água utilizada para preparo das tripas e o manipulador estivessem contaminados, não foi encontrada *Salmonella spp.* no produto final.

A ausência de *Salmonella spp.* no produto final refere-se apenas à amostra coletada. Não é possível afirmar que não haja contaminação no lote amostrado, visto que durante o processo de descanso da massa foi verificada a presença do

micro-organismo. Assim, por se tratar de um embutido frescal, não existe nenhum procedimento, como, por exemplo, o tratamento térmico que iniba o crescimento desse patógeno.

Partindo desse contexto, Mürmann et al. (2009); Dias et al. (2008); Spricigo et al (2008) avaliaram linguiças e outros embutidos e verificaram a contaminação por *Salmonella* que reflete a complexidade da cadeia de transmissão de patógenos, com muitas oportunidades para a infecção, reinfecção e contaminação cruzada durante as diversas etapas do processamento.

Roça (2004) em seu estudo verificou que a probabilidade de contaminação da carne durante todo processo de abate é alta e sua intensidade depende da eficiência das medidas higiênicas adotadas. O autor citado deixa também evidente a necessidade prevenir a contaminação cruzada através da realização de adequadas operações unitárias, praticando procedimentos corretos e padronizados, adotando boas práticas de higiene e monitorando minuciosamente todas as etapas da cadeia produtiva.

Portanto, diante desses resultados, verificou-se a necessidade de realizar um plano de ações corretivas, a fim de obter um controle mais efetivo das portas de entrada de contaminação na cadeia produtiva suína, melhorando a segurança microbiológica dos produtos do frigorífico estudado.

4.4 PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS

Após a avaliação dos pontos de contaminação na produção de carne suína e embutidos, foram selecionados cinco pontos, três relativos às instalações e dois à manipulação dos produtos. Nesses pontos foram aplicadas ações corretivas. Para os manipuladores foi aplicado um treinamento referente às BPF. Para reduzir a contaminação nas instalações do frigorífico, além do treinamento, foi elaborado um novo PPHO.

4.4.1 Treinamento dos Manipuladores

O treinamento consistiu em informar os funcionários quanto aos contaminantes alimentares, às doenças transmitidas por alimentos (DTA's), à

manipulação higiênica dos alimentos, à higiene pessoal e operacional e às Boas Práticas de Fabricação/Manipulação (BPF), conforme sugere a RDC n.º 216/04 (BRASIL,2004).

O treinamento teve o intuito de promover a conscientização dos manipuladores com relação à veiculação da contaminação oriunda de práticas inadequadas de higiene, visto que dentre os 44% de mão de obra qualificada e semi qualificada observa-se a falta de informação desses profissionais quanto às normas de segurança alimentar na produção de alimentos. Os manipuladores são indicados como responsáveis direta e indiretamente por até 26% dos surtos de enfermidades bacterianas veiculadas por alimentos (SILVA et al., 2006).

Portanto, treinamentos de funcionários para a manipulação de alimentos são requisitos básicos para implantação de programas de qualidade (TAVOLARO, 2006;CODEX ALIMENTARIUS, 2006), uma vez que os manipuladores de alimentos têm importante papel na veiculação de micro-organismos para o alimento manipulado.

Durante o treinamento, os funcionários mostraram-se interessados, expondo suas opiniões, participando e esclarecendo dúvidas. De acordo com Santos (1999), um dos itens para se obter sucesso durante o treinamento é ouvir a equipe, pois, o funcionário se sente mais valorizado quando tem a liberdade de expressar suas opiniões.

4.4.2 PPHO para Instalações

Com o intuito de melhorar os procedimentos de higienização do frigorífico em estudo foi elaborado um novo PPHO para aplicação nas instalações frigoríficas.

Lopes (2008) enfatiza a importância do estabelecimento de um PPHO, visto que uma das consequências mais graves da má higienização nas indústrias de alimentos é a possível ocorrência de intoxicações alimentares. Este problema só pode ser evitado através do estabelecimento de procedimentos de higiene e sanitização, envolvendo todo o processo da cadeia produtiva, visando prevenir e corrigir problemas que possam levar à contaminação dos alimentos.

Para a elaboração do PPHO, o trabalho baseou-se nas portarias do Ministério da Saúde. Sendo elas: Portaria n° 1.428, de 26 de novembro de 1993, que

estabelece um Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos (BRASIL, 1993) e portaria nº 326, de 30 de julho de 1997, que trata de Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores e Industrializadores de Alimentos (BRASIL, 1997), bem como, na resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002, da ANVISA, que institui um Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/ Industrializadores de Alimentos e Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/ Industrializadores de Alimentos (BRASIL, 2002). A Figura 8 mostra o modelo do PPHO elaborado e implantado no frigorífico.

PROCEDIMENTO PADRÃO DE HIGIENE OPERACIONAL PADRÃO – PPHO				Número de Páginas 1
Código CQ-005	Data de Emissão 08/2012	Data de Vigência 09/2012	Próxima Revisão 09/2014	Versão nº 02
EMITIDO POR: Renata Samulak				
APROVADO POR:				
ASSUNTO: Procedimento de Higienização de instalações				
<p>1. OBJETIVO: Estabelecer procedimentos de higienização das instalações.</p> <p>2. DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA:</p> <p>✓ Portaria nº 1428, de 26 de novembro de 1993 – MS</p> <p>Aprova o Regulamento Técnico para a inspeção sanitária de alimentos, as diretrizes para o estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos e o Regulamento Técnico para o estabelecimento de padrão de identidade e qualidade para serviços e produtos na área de alimentos.</p> <p>✓ Portaria nº 326, de 30 de junho de 1997 – MS</p> <p>Aprova o Regulamento Técnico "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores Industrializadores de Alimentos".</p> <p>✓ Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997–MAPA</p> <p>Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores Industrializadores de Alimentos.</p> <p>✓ Portaria nº 216, de 15 de setembro de 2004 ANVISA</p> <p>Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação.</p> <p>✓ Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002- ANVISA</p> <p>Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores Industrializadores de Alimentos.</p>				

3. DEFINIÇÕES:

Limpeza: É a operação que elimina sujidades. Essa operação é realizada com auxílio de produtos detergentes escolhidos em função da natureza dos resíduos e das superfícies a serem limpas.

Sanitização: É o conjunto de operações realizadas com o objetivo de eliminar os micro-organismos patogênicos.

4. **LOCAL DE APLICAÇÃO:** Em todas as áreas da instalação, incluindo, piso, parede, teto, equipamentos, plataformas e câmaras-frias.

5. PROCEDIMENTO:

Etapas da limpeza e sanitização:

- **Remover os resíduos:** Retirar os resíduos sólidos e líquidos em contato com a superfície;
 - **Fazer uma pré-lavagem:** Remover ou dissolver os resíduos das superfícies somente com água.
 - **Lavar:** remover o material orgânico utilizando-se agentes químicos detergentes. Utilizar detergente alcalino clorado na concentração de 5%. Deixar agir por 10 minutos.
 - **Enxaguar:** remover os resíduos de detergente através da circulação de água. **Sanitizar:** Aplicar em todas as superfícies, por pulverização, solução sanitizante a base de ácido peracético na concentração de 1%. Não é necessário enxaguar.
6. **FREQUÊNCIA:** Logo após o processo produtivo, quando houver troca de produtos a serem produzidos ou quando houver a necessidade.
7. **A QUEM SE APLICA:** Aos funcionários responsáveis pelo procedimento de higienização.
8. **VERIFICAÇÃO E REGISTRO:** O chefe de controle de qualidade ao final do procedimento de limpeza deverá fiscalizar, através de observação visual, com auxílio de uma lanterna, a fim de facilitar a identificação de não conformidades de higienização. Em seguida, anotar em planilha de registro nº 002.
9. **AÇÕES CORRETIVAS:** Caso a superfície esteja mal higienizada o procedimento descrito anteriormente deverá ser repetido.

Figura 8 - PPHO para higienização de instalações

Fonte: Autoria própria (2012)

As principais alterações realizadas para novo PPHO consistiram em modificar o procedimento de higienização já existente na empresa. Anteriormente, o frigorífico realizava a etapa de lavagem utilizando detergente neutro. Substituiu-se por detergente alcalino clorado, composto a base de hidróxido de sódio e hipoclorito de Sódio, na concentração de 5% recomendada pelo fabricante do produto.

O detergente alcalino clorado tem sido bastante utilizado na indústria alimentícia pelo seu poder de remover filmes de proteínas, além de ação

desengordurante (BAPTISTA, 2003). Esse mesmo autor destaca que os detergentes alcalinos são mais eficientes que os neutros, e quando clorados, em geral, são mais agressivos, permitindo liberar sujidades a base de proteínas e sujidades aderidas as superfícies, como é o caso do frigorífico em estudo.

Outra alteração no PPHO foi a adição da etapa de sanitização. Antes a empresa não realizava este procedimento. Foi instituída a realização dessa etapa, diariamente, após a etapa de limpeza.

O sanitizante utilizado para este estudo foi a solução de ácido peracético na concentração de 1%, devido a sua eficiência demonstrada em estudos desenvolvidos por Kichet al. (2004); Machado et al. (2010) e Colla et al. (2012) para controle de Salmonelas.

Segundo Kitis (2004), o ácido peracético é um poderoso oxidante e desinfetante devido sua combinação de oxigênio ativo característico dos peróxidos, dentro de uma molécula de ácido acético, pertencendo à classe dos peróxidos orgânicos fabricados sinteticamente.

De acordo com Baptista (2003), esse desinfetante apresenta-se incolor, pH ácido e forte odor avinagrado, é indicado para aplicação em materiais em aço inoxidável, plásticos, borrachas, metais brandos e superfícies em contato direto com alimentos. Pode ser utilizado para limpeza por imersão ou aspersão e apresenta custo relativamente moderado.

4.5 VERIFICAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PLANO DE AÇÕES CORRETIVAS

Após um mês de implantação e acompanhamento da execução do plano de ações corretivas aplicado ao frigorífico, foram coletadas amostras de *swab* de superfícies de paredes e mãos de manipuladores, escolhidas intencionalmente, com base nos resultados obtidos no item 4.3 com o intuito de verificar sua eficiência. As amostras foram coletadas durante o processo de abate e fabricação de linguiça frescal e foram submetidas à análise de *Salmonella*. Os resultados obtidos estão representados no Quadro 4.

Amostra	Resultado
Swab da parede da sangria	Ausência
Swab da parede da câmara fria de resfriamento de carcaças	Ausência
Swab da parede da câmara de descanso de massas	Ausência
Mãos do manipulador do setor de desossa	Ausência
Mãos do manipulador do setor de embutimento	Ausência

Quadro 4 - Resultados da análise de *Salmonella spp.* via PCR após a aplicação do plano de ações corretivas

Fonte: autoria própria

Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois refletem a eficiência do plano de ações aplicado, visto que houve ausência de *Salmonella spp.* nos cinco pontos amostrados.

Com relação ao treinamento, foi constatado que houve conscientização por parte dos manipuladores da importância das Boas Práticas de Fabricação e, principalmente, da higiene pessoal devido à ausência do micro-organismo nas mãos dos manipuladores amostrados.

Um estudo semelhante desenvolvido por Silva et al. (2006), cujo objetivo era implantar a segurança microbiológica e qualidade dos alimentos em cozinha através de adequação de procedimentos relativos à higiene, obteve 99,7% de efetividade, quando avaliada a presença de micro-organismos patogênicos nas mãos de manipuladores após treinamento relativo a higiene pessoal.

Nesse sentido, Santos (1999) ressalta a importância de hábitos sanitários e práticas de higiene, uma vez que manipuladores com mãos contaminadas servem de veículo para disseminação de patógenos e outros agentes biológicos contribuindo para contaminação do produto final.

Lopes (2008) destaca que a implantação das BPF é um dos pontos de partida para melhoria da segurança alimentar e para sucesso dessa implantação é necessário o comprometimento por parte de todos os funcionários da empresa. O autor comenta ainda, que o trabalhador treinado adequadamente identificará as falhas no processo de produção e também pode colaborar como agente disseminador. Portanto a higiene pessoal é um pré-requisito para qualquer atividade de controle da qualidade.

A aplicação do PPHO nas superfícies avaliadas também pode ser considerada eficiente para controle de *Salmonella spp.*, devido à ausência do micro-organismo nas amostras.

A substituição do tipo de detergente utilizado na etapa de lavagem aliado a inclusão da etapa de sanitização contribuiu para esse resultado. O ácido peracético, na concentração de 1%, escolhido como sanitizante para controle de *Salmonella spp.* mostrou-se satisfatório.

Outros estudos também constataram a eficiência do ácido peracético frente à *Salmonella spp.* Kich et al. (2004), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de seis desinfetantes frente a salmonela isolada de suínos, constatou que, mesmo na presença de matéria orgânica, o ácido peracético na concentração de 1% não teve sua eficácia afetada.

Colla et al. (2012) isolou *Salmonella* de vinte amostras de diferentes pontos do processo de abate de frangos em um mesmo frigorífico para avaliar a eficiência de três princípios ativos rotineiramente utilizados para sanitização de abate avícola, dentre eles o ácido peracético e verificou que esse sanitizante foi eficiente para 100% das amostras analisadas.

Machado et al. (2010) avaliaram a resistência de três cepas de *Salmonella* frente aos desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. E verificou que, na concentração de 1% recomendada pelo fabricante e na metade dessa concentração, o ácido peracético foi capaz de inativar as cepas de *Salmonella*.

Porém, apesar do ácido peracético se mostrar eficaz no controle de *Salmonella spp.*, Colla et al. (2012) enfatizaram a necessidade de se realizar a rotação de princípios ativos nos procedimentos de higienização devido à progressão da resistência bacteriana frente aos sanitizantes.

Portanto, mesmo os resultados obtidos sendo satisfatórios neste momento, o controle da qualidade e a implantação de novos procedimentos higiênico-sanitários devem ser constantes, visando à melhoria contínua do produto final, garantindo assim, um alimento seguro à comunidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa partiu do pressuposto que dentro da produção de carne suína e derivados embutidos existem micro-organismos patogênicos de origens distintas causadores de contaminação. O presente estudo buscou avaliar os pontos de contaminação por *Salmonella spp.*, propondo uma metodologia mais rápida e eficiente para melhorar o controle de qualidade. Além disso, medidas corretivas foram implantadas, a fim de garantir maior segurança microbiológica ao produto final.

Com relação à proposta metodológica empregada, ajustes metodológicos na amplificação do DNA foram necessários para otimização da técnica às condições do laboratório utilizado para o estudo. Padronizou-se o método de extração do DNA bacteriano, optando por utilizar o método de lise térmica, o que facilitou o processo de análise devido agilidade no procedimento de avaliação.

Foram estabelecidas as condições da reação da PCR para *Salmonella spp.* com relação à concentração do DNA (40 ng) e temperatura ideal de anelamento de 57°C. Foi verificada a necessidade de adoção da *Nested PCR* para exclusão de resultados falsos negativos. A técnica aumenta a sensibilidade da reação, melhorando a nitidez das bandas, diminuindo assim a ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos.

A utilização da técnica de PCR mostrou-se vantajosa nos seguintes aspectos: método de extração do DNA bacteriano rápido e econômico com resultados satisfatórios, tempo de análise total de aproximadamente 30 horas e maior sensibilidade quando comparado ao método convencional.

Os resultados obtidos na avaliação dos pontos de contaminação por *Salmonella spp.* indicaram que das 62 amostras analisadas, 60% delas estavam contaminadas com o micro-organismo. A contaminação estava presente nos animais vivos, bem como, no ambiente de abate, desossa da carne e produção de embutidos.

Apesar do produto final analisado não apresentar a presença do micro-organismo, todo cuidado deve ser tomado, a fim de reduzir a contaminação na produção de carne suína e embutidos, visto que pode ocorrer contaminação cruzada, uma vez que o ambiente estudado apresentou diversos pontos de contaminação que podem vir a contaminar o alimento no decorrer da sua produção.

Para tanto, o plano de ações foi elaborado, a fim de melhorar as condições higiênico-sanitárias do estabelecimento.

A efetividade do plano foi evidenciada, através da ausência de *Salmonella spp.* nas amostras avaliadas, ressaltando a importância do treinamento de manipuladores de alimentos, bem como, a padronização dos procedimentos de higiene operacional. A utilização de detergente alcalino na remoção de filmes de proteínas e gordura, assim como, a adição da etapa de sanitização, utilizando o ácido peracético, contribuiu para a melhoria das condições higiênico-sanitárias do frigorífico e, conseqüentemente irá oferecer ao mercado consumidor um produto com maior qualidade microbiológica.

Porém, para garantir a segurança alimentar na produção de carne suína e derivados embutidos, a avaliação dos pontos críticos de contaminação, o controle de qualidade, a implantação das boas práticas de fabricação e procedimentos de higiene operacional, com treinamento de funcionários deverão ser constantes, visando a melhoria contínua do processo.

Como sugestão para trabalhos futuros, visando à continuidade do tema pesquisado, propõe-se a realização o sequenciamento após PCR para identificação taxonômica e variabilidade genética das espécies de *Salmonella* isoladas nas diferentes etapas do processo de abate suíno e produção de embutidos derivados, a fim de verificar as origens das contaminações. Sugere-se adicionalmente a validação do protocolo proposto para avaliação de contaminação na produção de carne suína e embutidos por outros micro-organismos patogênicos como, por exemplo, *Listeria monocytogenes*. E ainda, a realização de plano de ações em cada uma das etapas do processo críticas de contaminação.

REFERÊNCIAS

ABIPECS- Associação Brasileira da Indústria Produtora Exportadora de Carne Suína. **Principais destinos da carne suína Brasileira**. jan./abr. 2011. Disponível em: < <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mercado-externo/destinos.html>>. Acesso em: 04 jun. 2011.

_____. **Panorama da Carne suína Brasileira**. jan. 2010. Disponível em:< http://www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/documentos-tecnicos/Especial_Suinoicultura_-_Agroanalysis.pdf>. Acesso em 13 abr.2012.

ALMEIDA, P. F., ALMEIDA, R. C.C. A PCR protocol using *inl* gene as target for specific detection of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 11, p.97-101,2000.

ALVES, J. **PCR multiplex para detecção de *Campylobacter spp.* e *Salmonella spp.* em carne de Frango**.2010. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos alimentos)- Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ANDREATTI FILHO, R. L., GONÇALVES, G. A. M.OKAMOTO, A. S., LIMA, E. T. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de *salmonella entérica* sorovar *enteritidis* em produtos avícolas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 12, n. 1, p. 115-119, jan./mar. 2011.

ARNOLD, T. SCHOLZ, C. MARG, H., RÖSLER, U., HENSEL, A. Impact of invA-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of *salmonella* in the flesh, Internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Disease Veterinary Public Health**, v. 5, n. 10, p. 459-463, 2004.

BAPTISTA, P. **Higienização de equipamentos e instalações na indústria Agroalimentar**. Forvisão – Consultoria em Formação Integrada LTDA. 2003. 68p.

BERENDS, B. R.; VAN KNAPEN, F.; SNIJDERS, J. M. A.; MOSSEL, D. A. A. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 199-206, 1997.

BEZZERA,W. I; MARTINS,T. D. D. Análise dos Pontos Críticos em uma unidade frigorífica de abate de suínos em Igarassu-PE. In: Jornada Nacional da Agroindústria, 2, 2008, Bananeiras, **Anais..** Universidade Federal da Paraíba, 2008.

BORCH, E.; NESBASKKEN, T.; CHRISTEN, H. Harzard identification in swine slaughter with respect to food born bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.30. p. 9-25, 1996.

BRASIL - Ministério da Agricultura. R.I.I.S.P.O.A. 1980. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Aprovado pelo decreto nº 30690, de 20.03.52, alterado pelo decreto nº 1255, de 25.06.52). **Diário Oficial da União**, Brasília. 66p. 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 711, Normas Técnicas de Instalações e Equipamentos de Abate e Industrialização de Suínos, de 1º de Novembro de 1995. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção I, p. 17625, 03 nov. 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 368, de 4 de setembro de 1997: aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-sanitárias e Boas Práticas de Elaboração para estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção I, p. 19697-19699, 8 set 1997b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.428, de 26 de novembro de 1993. Regulamentos Técnicos sobre Inspeção Sanitária, Boas Práticas de Produção/Prestação de Serviços e Padrão de Identidade e Qualidade na Área de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Sec. I. p. 18415-18419, 02 dez. 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Indústrias de Alimentos. **Diário oficial da União**, Brasília, 01 ago. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Resolução nº 275, de 21 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, 06 de Nov. 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. O Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprovado pela Resolução - RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de set. 2004.

CARMO, G. M. I., OLIVEIRA, A. A., DIMECH, C. P., SANTOS, D. A., ALMEIDA, M. G., BERTO, L. H., ALVES, R. M. S., CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.6, p. 1-7, 2005.

CASTAGNA, S. M. F., MULLER, M., MACAGNAN, M., RODERBUSCH, C.R., CANAL, C.W., CARDOSO, M. Detection of *salmonella spp.* from porcine origin: a comparison between a PCR method and standard microbiological techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v 36, p. 373-377, 2005.

CHAPMAN, P. A., ELLIN, M., ASHTON, R., SHAFIQUE, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157H7 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 11-20, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. **Higiene dos alimentos – Textos básicos**. Programa Conjunto Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2006.

COLLA, F. L., RODRIGUES, L. B; DICKEL, E. L; BORSOI, A.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. Avaliação in vitro da clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente à amostras de *Salmonella heidelberg* isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, p.289-292, 2012.

CORTEZ, A. L. L. **Indicadores de qualidade higiênico-sanitária em linguiça frescal comercializada no Município de Jaboticabal-SP**. 2003. 42f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

CUSATO, S. **Relação custo benefício da implantação do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) em laticínio do estado de São Paulo**. 2007. 149f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

DIAS, P.A.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; COELHO, F.J.O.; TEJADA, T.S.; SEGATTO, M.; TIMM, C.D. Qualidade Higiênico-sanitária de carne bovina moída e embutidos frescos comercializados no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.75, n.3, p.359-363, jul./set., 2008.

FERREIRA, A.C.R. **Avaliação de três métodos de extração de DNA de *Salmonella spp* em ovos de galinhas contaminados artificialmente.** 2011.55f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Programa de Pós- Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

FIESP. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. **Guia Técnico Ambiental de Abate (Bovino e Suíno) – Série P+L.** 2006.

FIGUEIREDO, R. M. **Programa de Redução de Patógenos- Padrões e procedimentos operacionais de sanitização.** São Paulo: Manole, 2002. 164p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2005, 424p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2010. 182 p.

FRAZIER, W.C., WESTOFF, D.C., **Microbiologia de los alimentos.** Zaragoza: Ed. Acribia, 1993. 681p.

FREITAS, C. G. **Adaptação da Técnica de PCR múltipla para a identificação de *Salmonella spp* e dos sorotipos *tiphy*, *enteridis* e *typhimurium* por carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal.** 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2008.

FURTINI, L.L.R., ABREU, L.R. Utilização de APPCC na Indústria de Alimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras. v.30, n.02.p.358-363, 2006.

GALAN, J. E., GINOCCHIO, C., COSTEAS, D.P. Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene *InVA*: homology of *InVA* to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v.174, p.4338-4349, 1992.

GAMARRA, R. M. **Identificação dos pontos Críticos para *Salmonella spp* no abate de suínos.** 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de pós- graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

GARCIA, P. M., ARCURI, E. F., BRITO, M. A. V. P., LANGE, C. C., BRITO, J. R. F., CERQUEIRA, M.M.O.O.P. Detecção de *Escherichia coli* O157H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR multiplex. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte. v.60, n. 05, out, 2008.

GERMINNI, A., MASOLA, A., CARNEVALI, P., MARCHELLI, R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. **Food Control**, v.20, p.733-738, 2009.

GIL, Antonio Carlos. **Como elaborar projetos de pesquisa**. São Paulo: Atlas, 1991.

GILL, C.O.; LANDERS, C. Microbiological effects of carcass decontaminating treatments at four beef packing plants. **Meat Science**, v.65, p.1005-1011, 2003.

HULEBACK, K. L., SCHLOSSER, W. HACCP history and conceptual over view. **Risk Analysis**, v. 22, p. 547-552, 2002.

ICMSF -International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997, 377p.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 6 ed. 711p.

KICH, J. D.; BOROWSKY, L. M.; SILVA, V. S.; RAMENZONI, M.; TRIQUES, N.; KOOLER, F. L.; CARDOSO, M.R.I. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente à amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.33-39, 2004.

KITIS, M. Disinfection of waste water with peracetic acid: a review. **Environment International**, v. 30, p. 47-55, 2004.

LAKATOS, E M., MARCONI, M. A. **Fundamentos de metodologia científica**. São Paulo: Atlas. 6ª. Ed, 2005.

LIMA, A. W. O., SOUSA, C. P. Infecções e intoxicações alimentares. In: **Aspectos da ciência e tecnologia de alimentos**. 1ª ed. João Pessoa, PB: Nova Ideia, v. 1, p.175-199, 2002.

LIMA, E..S.C.; PINTO, P.S.A.; SANTOS, J.L.; VANETTI, M.C..D.; BEVILACQUA, P.D.; ALMEIDA, L.P.; PINTO, M.S.; DIAS, F.S. Isolamento de *Salmonella spp* e *Staphylococcus aureus* no processo de abate de suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n.4, p. 185-190, 2004.

LOPES, R. P. **A importância da higiene pessoal em um Programa de Boas Práticas de Fabricação**. 2008. 40f. Monografia (Especialização). Programa de Pós Graduação em Vigilância em Saúde e Defesa Sanitária Animal – Universidade Castelo Branco, Campo Grande, 2008.

MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônia e hipoclorito de sódio. **Revistado Instituto Adolfo Lutz**,v.69, p.475-481, 2010.

MALDONADO, A. G. **Ocorrência de *Salmonella spp.* em amostras de frango obtidas em uma feira e um mercado municipal da zona oeste da cidade de São Paulo**: Uma análise crítica entre técnica convencional em meios de cultura e reação em cadeia pela polimerase-PCR. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MANTILLA, S. P. S., FRANCO, R. M., OLIVEIRA, L. A. T., SANTOS, E. B., GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, v.14, n. 1, p. 180-192, 2007.

MARRA,K. N. **Dinâmica microbiana da sala de desossa em um matadouro-frigorífico de Goiânia- GO, durante a jornada de trabalho**. 2009. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

MARTINS, A.D., MENDONÇA, R. C., SODRÉ, A. F. Principais patógenos associados à carne suína. **Revista Nacional da Carne**, v. 332,p. 16-24, 2004.

MATIAS, B. G. **Contaminação microbiana de carcaças de frangos obtidas em dois sistemas de abate e avaliação de um protocolo de reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção de *Salmonella spp.***. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade de Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MATSUBARA, E.N. **Condição higiênico- sanitária de meias carcaças de suínos após o abate e depois do término do resfriamento e análise da utilização de Lista de Verificação para avaliar boas práticas de abate de suínos.** Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós- Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MC MULLEN LM .Intervention strategies to improve the safety of pork. **Advances of Pork Production**, v.11,p.165-173, 2000.

MICHALCZYSZYN, M.; GIROTO, J. M.; BORTOLOZO, E. Q. Avaliação e Certificação em Boas Práticas de Fabricação de uma empresa de alimentos orgânicos no município de Ponta Grossa, Pr – estudo de caso. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n. 159, p. 33-35, mar. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dados Epidemiológicos- DTA's período de 2000-2011.** Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos_dta_15911.pdf>. Acesso em 20 abr. 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Suínos: Mercado Interno**, 2010. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/suinos>>. Acesso em 15 abr. 2012.

MOLINA, A. L., TOBO, P. R. **Uso das Técnicas de Biologia Molecular para diagnóstico.** Série - Biologia Molecular atualização, Parte 2. Editora Associada Einsten. v. 2, n. 2, p. 139-140, 2004.

MULLIS, K. B., FALONNA, F. A., Specific Synthesis of DNA in vitro via polymerase catalyzed chan reaction. **Methods in Enzimology**, v.155, p.335-350, 1987.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M.C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v.20, p.191-196, 2009.

OLIVEIRA, W. F. S. **Implantação de sistemas de gestão para a garantia da segurança de alimentos. Estudo de Caso: Linha de fabricação de filé de peixe congelado.** 2008. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.

PELISSER, M. R.; KLEIN, C. S.; ASCOLI, K. R.; ZOTTI, T. R.; ARISI, A. C. M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, Florianópolis, v. 40, p. 145-148, 2009.

PERES, N. D. **Detecção de *Listeria monocytogenes* em leite: Sensibilidade e Especificidade da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. 2007. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ROÇA, R. O. **Microbiologia da carne**. UNESP, Campus de Botucatu, 2004. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/tecarne.htm>. Acesso em: 12 set. 2010.

SABA, R. Z., BÜRGER, K. P., OSWALDO JUNIOR, D. R. Influência da pressão e temperatura da água de lavagem na população microbiana da superfície de carcaças bovinas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1-6, 2010.

SANTOS, L. A. G. ***Listeria monocytogenes* em suínos abatidos: subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle- APPCC**. 2003. 48f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

SANTOS, L. A. G., PINTO, P. S. A., MORAES, M. P., VANETTI, M. C. D., BEVILACQUA, P. D., MAYARA, S. P. DIAS, F.S. Pesquisa molecular e convencional de *Listeria monocytogenes* para controle de qualidade da carne suína. **Revista Ceres**, v. 53, n. 308, p. 481-486, 2006.

SANTOS, S. F. **Treinando manipuladores de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela Ltda., 1999. 122p.

SEIXAS, F.N., TOCHETTO, R., FERRAZ, S.M. Presença de *Salmonella spp.* em carcaças suínas amostradas em diferentes pontos da linha de processamento. **Ciência Animal Brasileira**, v.10,n.2, p.634-640, 2009.

SILVA, A. B. P.; COUTO, S. M.; TÓRTORA, J. C. O. O controle microbiológico dos manipuladores, como indicativo da necessidade de medidas corretivas higiênico-sanitárias, em restaurante comercial. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 36-39, out. 2006.

SILVA, E. L.; MENEZES, E. M. **Metodologia da pesquisa e elaboração de dissertação**. Florianópolis: UFSC. 4ª Ed. 2005.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3ªEd. Editora: VARELA, 1997.

SOUZA, L. H. L.A manipulação inadequada dos alimentos: fator de contaminação. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 146, p.32-39, nov. 2006.

SPERS, E. E. Qualidade e segurança em alimentos. **Economia e Gestão dos Negócios Agroalimentares**. São Paulo: Pioneira, p. 283-321, 2000.

SPRICIGO, D. A.; MATSUMOTO, S.R.; ESPINDOLA, M. L.; FERRAZ, S. M. Prevalência, quantificação e resistência de antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados em linguiça frescal suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 779-785, out- dez. 2008.

TAVOLARO, P. et al. Evaluation of the knowledge in hygiene practices: a qualitative approach. **Interface - Comunicação, Saúde, Educação**, v.10, n.19, p.243-54, jan/jun 2006.

TEODORO, V.A.M.; PINTO, P.S.A.; VANETTI, M.C.D.; BEVILACQUA, P.D.; MORAES, M.P.; PINTO, M.S. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.1, p. 9-14, 2006.

TERRA,N.N.; FRIES,L.L.M. **A qualidade da carne suína e sua industrialização**. 1ª Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína, Embrapa, Concórdia, Santa Catarina, p.147-151, 2001.

THORBERG B.M., ENGVALL A. Incidence of *Salmonella* in five Swedish slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v.64, n.4, p.542-545, 2001.

VAN DER GAAG, M.A.; SAATKAMP, H. W.; BACKU, G.B.C.; VAN BEEK, P.; HUIRNE, R. B. M. Cost-effectiveness of controlling *Salmonella* in the pork chain. **Food Control**, v.15, p.173-180, 2004.

VAN SCHOTHORST, M., ZWIETERING, M. H., ROSS, T., BUCHANAN, R. L., & COLE, M. B. Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives. **Food Control**, v.20, n.11, p.967-979, 2009.

VANDERZANT, C; SPLITTSTOOSER, RDF. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 15^a ed.; Washington, DC. APHA, 1992. 1219p.

VON RUCKERT, D. A. S. **Comparação dos métodos microbiológicos convencional, imunoanálise e reação polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella spp.* em frangos durante o abate**. 2006. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2002. **Food safety: A revolution of the executive board of the world health organization**. Resolution EB 105.