

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

SANDRA ZABOT

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E  
COMPOSTOS CLORADOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS  
PATOGENICOS EM CARNE DE FRANGO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA  
2016

SANDRA ZABOT

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E  
COMPOSTOS CLORADOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS  
PATOGENICOS EM CARNE DE FRANGO**

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto.

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre da Trindade Alfaro.

LONDRINA  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

Z12a Zobot, Sandra  
Atividade antimicrobiana de ácidos orgânicos e compostos clorados sobre micro-organismos patogênicos em carne de frango / Sandra Zobot. - Londrina: [s.n.], 2016.  
97 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre da Trindade Alfaro  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2016.  
Bibliografia: f. 87-97

1. Frango de corte. 2. Salmonela. 3. Microorganismos. 4. Ácidos orgânicos.  
5. Cloro. I. Hashimoto, Elisabete Hiromi, orient. II. Alfaro, Alexandre da Trindade, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
**Título da Dissertação N° 40**

**“Atividade Antimicrobiana de Ácidos Orgânicos e  
Compostos Clorados sobre Micro-organismos  
Patogênicos em Carne de Frango”**

por

**Sandra Zabot**

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina, às 14h do dia 30 de março de 2016. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto  
Prof.<sup>a</sup> Orientadora  
UTFPR Câmpus Francisco Beltrão

---

Dr. Jean Carlos Brustolin  
Membro Titular  
URI Câmpus Erechim

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kérley Braga Pereira Bento Casaril  
Membro Titular  
UNIOESTE Câmpus Francisco Beltrão

Visto da coordenação:

---

Prof. Dr. Fábio Augusto Garcia Coró  
(Coordenador do PPGTAL)

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Dedico este trabalho aos meus familiares,  
amigos e colegas de trabalho, pois me  
deram todos os alicerces para que sua  
realização se tornasse possível.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela oportunidade de vivenciar essa fase de mestranda, a qual me proporcionou experiências, conhecimentos e amizades que levarei para a vida inteira.

Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná, à Coordenação do Curso de Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos e à todo o corpo docente do Câmpus de Francisco Beltrão. Agradeço com destaque à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto, pois através dela cada etapa foi essencial e fundamental para o meu crescimento e desenvolvimento enquanto mestranda. Agradeço por toda a dedicação e comprometimento das alunas de iniciação científica, Naara, Janice e Bruna, sem as quais a realização das etapas iniciais do trabalho não teria sido concretizada. Agradeço também aos Professores Drs. Alexandre e Fernanda e ao aluno Herrison do Câmpus de Londrina pela realização de uma das etapas do trabalho, a qual teve uma contribuição significativa. E agradeço também à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira por ceder as cepas utilizadas nos experimentos.

Estendo meus agradecimentos à empresa por oportunizar e incentivar a realização do mestrado. Em especial, agradeço à minha gerente e ao meu coordenador os quais permitiram a ausência das minhas atividades para cumprir a carga letiva exigida pelo programa, bem como me possibilitaram todas as condições para a realização do trabalho, desde o despendimento de recursos financeiros, auxílio técnico, até a confiança e expectativa no trabalho desenvolvido. Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas de mestrado, os quais hoje são considerados meus amigos, Fabiana, Marilde, Elton, Job, Sandro e João. Com eles, as aulas eram um conjunto de discussões técnicas, chimarrão e boas conversas.

De forma especial, agradeço aos meus familiares, os quais sempre me deram toda a força e coragem necessária para seguir em frente, compreendendo minha ausência durante o período de realização do curso.

Para finalizar, estendo os agradecimentos às demais pessoas que de alguma forma, à sua maneira, foram fundamentais para que a concretização desse trabalho se tornasse possível.

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”*

*Roberto Shinyashiki*

## RESUMO

ZABOT, Sandra. **Atividade Antimicrobiana de Ácidos Orgânicos e Compostos Clorados sobre Micro-organismos Patogênicos em Carne de Frango**. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

O cenário atual da produção avícola brasileira é definido pela alta produtividade motivada pelas exportações para mercados com elevados níveis de exigência sanitária. O trabalho objetivou avaliar a eficácia de compostos clorados (dióxido de cloro, dicloro e tricloro) e ácidos orgânicos (ácidos cítrico, láctico e peracético) na redução da contaminação de carne de frango por *Salmonella* spp., mesófilos e enterobactérias. Foram isoladas 102 cepas de *Salmonella* spp. de carcaças de frango no período de junho a setembro de 2014. As cepas foram identificadas por PCR. Determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos para as cepas padrões de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*. A CIM dos ácidos láctico e peracético (20 e 10 g/L) foi aplicada em cepas de *Salmonella* spp. isoladas do frigorífico. A CIM dos compostos ácido láctico e dicloro foi aplicada em água de *chiller* contaminada com *Salmonella* ( $10^9$  UFC/mL) e foi determinada a contagem de *Salmonella* presente na água. Coxas e sobrecoxas de frango foram contaminadas com *S. Heidelberg* ( $10^9$  UFC/mL) e foram aplicados os compostos dicloro (60 mg/L), ácido láctico (20 g/L) e hipoclorito de sódio (5,0 e 0,5 mg/L). Na identificação por PCR, 93,1% das cepas foram identificadas como *Salmonella* spp. Para o dicloro a CIM foi de 60 mg/L por 15 minutos para *S. Heidelberg* e 60 mg/L por 20 minutos para *S. Enteritidis*. O ácido láctico apresentou CIM de 5 g/L por 10 minutos para *S. Enteritidis*, 10 g/L por 15 minutos para *S. Typhimurium* e 20 g/L por 20 minutos para *S. Heidelberg*. Para o ácido peracético, as CIMs foram de 10 g/L por 10 minutos para *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* e 10 g/L por 20 minutos para *S. Enteritidis*. Para o ácido cítrico, as CIMs foram de 10 g/L por 10 minutos para *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* e 25 g/L por 20 minutos para *S. Heidelberg*. Nas cepas de *Salmonella* isoladas, o ácido láctico inibiu 97,89% das cepas e o peracético inibiu 100% das cepas. Na água de *chiller* contaminada os compostos reduziram o crescimento das cepas padrões. Quando aplicados em carne de frango contaminada, houve redução de *Salmonella* spp. de  $1,06 \log_{10}$  UFC/g em relação ao controle positivo com o hipoclorito de sódio a 5,0 mg/L,  $0,97 \log_{10}$  UFC/g com o dicloro e  $0,56 \log_{10}$  UFC/g com o hipoclorito de sódio a 0,5 mg/L. Para mesófilos a redução observada foi de  $0,90 \log_{10}$  UFC/g em relação ao controle positivo com o hipoclorito de sódio a 5,0 mg/L,  $0,90 \log_{10}$  UFC/g com o dicloro e não havendo redução com o hipoclorito de sódio a 0,5 mg/L. Para enterobactérias a redução foi de  $1,0 \log_{10}$  UFC/g em relação ao controle positivo com o hipoclorito de sódio a 5,0 mg/L,  $0,79 \log_{10}$  UFC/g com o dicloro e  $0,22 \log_{10}$  UFC/g com o hipoclorito de sódio a 0,5 mg/L. O ácido láctico inibiu o crescimento bacteriano dos micro-organismos testados. Os dados obtidos reforçam a necessidade de discussões para regulamentar o uso de coadjuvantes de tecnologia no abate de aves.

**Palavras-chave:** *Salmonella* spp. Carne de Frango. Ácidos Orgânicos. Compostos Clorados. Concentração Inibitória Mínima.



## ABSTRACT

ZABOT, Sandra. **Antimicrobial Activity of Organic Acids and Chlorinated Compounds over Pathogenic Microorganisms in Poultry Meat.** 2016. 97 f. Dissertation (Mestrado Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos) - Federal Technology University - Paraná. Londrina, 2016.

The current scenario of the Brazilian poultry production is defined by high productivity motivated by exports to markets with elevated levels of sanitary requirement. The work aimed to evaluate the efficacy of chlorinated compounds (chlorine dioxide, dichloro and trichloro) and organic acids (citric, lactic and peracetic acids) in reducing the contamination of poultry by *Salmonella* spp., mesophiles and enterobacteriaceae. Were isolated 102 strains *Salmonella* spp. poultry carcass from June to September 2014. Strains were identified by PCR. Was determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial compounds for the standard strains of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and *S. Heidelberg*. MIC of lactic acid and peracetic acid (20 to 10 g/L) was applied in strains of *Salmonella* spp. isolated from the slaughter. The MIC of the compounds lactic acid and sodium dichloro was applied in contaminated *chiller* water with *Salmonella* ( $10^9$  CFU/mL) and this was determined *Salmonella* count in water. Thighs and drumsticks poultry were contaminated with *S. Heidelberg* ( $10^9$  UFC/mL) and were applied dichloro (60 mg/L), lactic acid (20 g/L) and sodium hypochlorite (5,0 and 0,5 mg/L) compounds. In the identification by PCR, 93,1% of the strains were identified as *Salmonella*. For sodium dichloro the MIC was 60 mg/L for 15 minutes to *S. Heidelberg* and 60 mg/L for 20 minutes for *S. Enteritidis*. Lactic acid presented MIC of the 5 g/L for 10 minutes to *S. Enteritidis* 10 g/L for 15 minutes to *S. Typhimurium* and 20 g/L for 20 minutes to *S. Heidelberg*. For peracetic acid, MICs were 10 g/L for 10 minutes to *S. Typhimurium* and *S. Heidelberg* and 10 g/L for 20 minutes to *S. Enteritidis*. To citric acid, MICs were 10 g/L for 10 minutes to *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* and 25 g/L for 20 minutes to *S. Heidelberg*. In the isolated *Salmonella* strains, lactic acid inhibited 97,89% of the strains and peracetic inhibited 100% of the strains. In contaminated *chiller* water, the compounds reduced the growth of standards strains. When applied to contaminated poultry meat, there was a reduction of *Salmonella* spp. 1,06  $\log_{10}$  CFU/g relative to the positive control with the use of sodium hypochlorite at 5,0 mg/L, 0,97  $\log_{10}$  CFU/g with dichloro and 0,56  $\log_{10}$  CFU/g with sodium hypochlorite 0,5 mg/L. For mesophiles reduction observed was 0,90  $\log_{10}$  CFU/g relative to the positive control with the use of sodium hypochlorite at 5,0 mg/L, 0,83  $\log_{10}$  CFU/g with dichloro and there isn't reduction with hypochlorite with sodium 0,5 mg/L. For enterobacteriaceae reduction was 1,0  $\log_{10}$  CFU/g relative to the positive control with the use of sodium hypochlorite at 5,0 mg/L, 0,79  $\log_{10}$  CFU/g with dichloro and 0,22  $\log_{10}$  CFU/g with sodium hypochlorite at 0,5 mg/L. Lactic acid inhibit growth of the microorganisms tested. The data supports the discussions to regulate the use of the technology coadjuvants in the slaughter of poultry.

**Keywords:** *Salmonella* spp. Poultry Meat. Organic Acids. Chlorinated Compounds. Minimum Inhibitory Concentration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Produção de Carne de Frango (milhões de toneladas).....	19
Figura 02 – Consumo Per Capita de Carne de Frango (kg/habitante).....	19
Figura 03 – Abate de Frangos em 2014.....	20
Figura 04 – Destino da Produção Brasileira de Carne de Frango em 2014.....	21
Figura 05 – Exportações Brasileiras de Carne de Frango (mil toneladas).....	21
Figura 06 – Exportações Brasileiras de Carne de Frango por Produto.....	22
Figura 07 – Os 25 Principais Importadores da Carne de Frango Brasileira em 2014 (mil toneladas).....	22
Figura 08 – Fluxograma do Abate de Aves.....	24
Figura 09 – Mapa do Frango.....	25
Figura 10 – Planejamento Experimental.....	43
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% mostrando os produtos de amplificação para o gene InvA.....	59
Figura 12 – Contagem de <i>Salmonella</i> spp.....	79
Figura 13 – Contagem de Mesófilos Totais.....	81
Figura 14 – Contagem de Enterobactérias.....	82

## LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Primers utilizados na reação em cadeia da polimerase.....	46
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Compostos Clorados e Concentrações Testadas.....	48
Tabela 02 – Ácidos Orgânicos e Concentrações Testadas.....	49
Tabela 03 – Distribuição das Alíquotas de Água de <i>Chiller</i> .....	53
Tabela 04 – Tratamento das Coxas e Sobrecoxas Artificialmente Contaminadas.....	55
Tabela 05 – Isolamento das Cepas de <i>Salmonella</i> spp. de Carcaças de de Frango.....	58
Tabela 06 – Identificação das Cepas de <i>Salmonella</i> spp. Isoladas por PCR.....	60
Tabela 07 – Atividade Antimicrobiana do Dióxido de Cloro na Inibição do Crescimento de <i>Salmonella</i> spp.....	61
Tabela 08 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Dióxido de Cloro com Leite e sem Leite.....	62
Tabela 09 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Tricloro Isocianúrico na Inibição do Crescimento de <i>Salmonella</i> spp.....	63
Tabela 10 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Ácido Tricloro Isocianúrico com Leite e sem Leite.....	64
Tabela 11 – Atividade Antimicrobiana do Dicloro Isocianurato de Sódio na Inibição do Crescimento de <i>Salmonella</i> spp.....	65
Tabela 12 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Dicloro Isocianurato de Sódio com Leite e sem Leite.	66
Tabela 13 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Lático na Inibição do Crescimento de <i>Salmonella</i> spp.....	67
Tabela 14 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Ácido Lático com Leite e sem Leite e pH Teórico.....	68
Tabela 15 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Peracético na Inibição do Crescimento de <i>Salmonella</i> spp.....	70
Tabela 16 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Ácido Peracético com Leite e sem Leite e pH Teórico	70
Tabela 17 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Cítrico na Inibição do Crescimento de <i>Salmonella</i> spp.....	72
Tabela 18 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Ácido Cítrico com Leite e sem Leite e pH Teórico.....	73
Tabela 19 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Lático e do Ácido Peracético sobre a Inibição de <i>Salmonella</i> spp. Isoladas do Frigorífico.....	75
Tabela 20 – Aplicação de Dicloro e Ácido Lático em Água de <i>Chiller</i> Artificialmente Contaminada.....	77

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CIM	Concentração Inibitória Mínima
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional

## **LISTA DE SIGLAS**

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
EFSA	European Food Safety Authority
FSIS	Food Safety and Inspection Service
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
3.1 AVICULTURA BRASILEIRA .....	18
3.2 PROCESSAMENTO DA CARNE DE FRANGO .....	23
3.3 QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO .....	26
3.4 MICRO-ORGANISMOS NA CARNE DE FRANGO .....	27
3.4.1 <i>Salmonella</i> spp. ....	28
3.4.2. Mesófilos Totais .....	31
3.4.3. Enterobactérias .....	32
3.5 ETAPAS DE ABATE E O CONTROLE DE <i>Salmonella</i> spp. ....	33
3.6 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS .....	35
3.6.1 ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	35
3.6.2 INDICAÇÕES DE USO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	37
3.6.3 COMPOSTOS CLORADOS .....	39
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
4.1 ISOLAMENTO DE <i>Salmonella</i> spp. DE CARÇAÇAS DE FRANGO .....	43
4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS POR PCR .....	46
4.3 COMPOSTOS CLORADOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS TESTADOS .....	47
4.4 MICRO-ORGANISMOS TESTADOS .....	50
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS CLORADOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	50
4.6 DETERMINAÇÃO DO pH DAS SOLUÇÕES TESTES .....	51
4.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE CEPAS ISOLADAS DO FRIGORÍFICO .....	51
4.8 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS EM ÁGUA DE CHILLER ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA .....	52
4.9 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) SOBRE A REDUÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp., MESÓFILOS TOTAIS E ENTEROBACTÉRIAS EM CARNE DE FRANGO .....	54
4.9.1 Contagem de <i>Salmonella</i> spp. ....	55
4.9.2 Contagem Total de Mesófilos (Método Petrifilm™ – 3M™) .....	56
4.9.3 Contagem de Enterobactérias (Método Petrifilm™ – 3M™) .....	56
4.9.4 Tratamento Estatístico dos Dados .....	57
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
5.1 ISOLAMENTO DE <i>Salmonella</i> spp. DE CARÇAÇAS DE FRANGO .....	58
5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS .....	59
5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS CLORADOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS .....	61
5.3.1 Compostos Clorados .....	61
5.3.2 Ácidos Orgânicos .....	67
5.4 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS SOBRE CEPAS ISOLADAS DO FRIGORÍFICO .....	75

5.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS EM ÁGUA DE <i>CHILLER</i> ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA.....	77
5.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) SOBRE A REDUÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp., MESÓFILOS TOTAIS E ENTEROBACTÉRIAS EM CARNE DE FRANGO .....	78
5.6.1 Contagem de <i>Salmonella</i> spp. ....	78
5.6.2 Contagem de Mesófilos Totais .....	80
5.6.3 Contagem de Enterobactérias.....	82
5.6.4 Efetividade dos Compostos.....	83
5.7 VIABILIDADE ECONÔMICA DOS COMPOSTOS TESTADOS .....	85
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## 1 INTRODUÇÃO

Segurança microbiológica e *shelf life* são conceitos importantes em relação à produção de carne de frango. O foco é dado principalmente sobre a ausência ou controle de micro-organismos potencialmente patogênicos como *Salmonella*, mas do ponto de vista comercial, há outras bactérias que também afetam a qualidade do produto final, como as deteriorantes. No que se refere à segurança dos alimentos, o ideal seria a produção de animais livres de patógenos, possibilitando alimentos com melhor qualidade microbiológica.

Intervenções na planta de abate podem não ser totalmente eficientes para remover os patógenos completamente. No entanto, existem algumas medidas de controle disponíveis, incluindo a separação de lotes, descontaminação de carcaças e implementação de um sistema de APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) equilibrado e operacionalizado (BOLDER, 2007).

No Brasil, o cenário do mercado da carne de frango modernizou-se em decorrência, principalmente, das exportações as quais, em detrimento das exigências microbiológicas restritivas, demandaram de melhorias no sistema para o controle microbiológico, sobretudo quanto à contaminação por *Salmonella* spp. (VON RÜCKERT, 2009).

Contudo, a preocupação dos abatedouros frigoríficos avícolas com a contaminação por micro-organismos patogênicos, indicadores e deterioradores é constante, visto que esses micro-organismos, além dos riscos à saúde do consumidor, podem acarretar barreiras de mercado pelos países importadores e, conseqüentemente, prejuízos econômicos e financeiros em toda a cadeia avícola.

De acordo com Doyle e Erickson (2006), para reduzir a contaminação por patógenos de origem alimentar, uma combinação de estratégias de intervenção torna-se necessária. Neste sentido, Buncic e Sofos (2012) relatam tratamentos que podem ser aplicados em carcaças de aves ou em suas partes, tais como água, vapor e soluções químicas (ácido láctico ou acético, compostos clorados dentre outros).

Os ácidos orgânicos têm sido utilizados para a descontaminação de produtos bovinos, suínos e de aves de várias bactérias, incluindo *Salmonella* spp. Estudos recentes descrevem novos tratamentos com ácidos orgânicos utilizando

uma tecnologia de barreiras apropriada para inibir *Salmonella* spp. (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012).

De maneira geral, a produção avícola brasileira tem focado cada vez mais no fornecimento de alimentos seguros e de elevada qualidade. Para alcançar esses objetivos, se faz necessária a avaliação da eficácia de novas técnicas que auxiliem e promovam o controle microbiológico.

Assim, este trabalho objetivou avaliar a eficácia de compostos clorados (dióxido de cloro, dicloro isocianurato de sódio e ácido tricloro isocianúrico) e ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido láctico e ácido peracético) no controle da contaminação de carne de frango por *Salmonella* spp., mesófilos totais e enterobactérias.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia de compostos clorados (dióxido de cloro, dicloro isocianurato de sódio e ácido tricloro isocianúrico) e ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido láctico e ácido peracético) no controle da contaminação de carne de frango por *Salmonella* spp., mesófilos totais e enterobactérias.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar cepas de *Salmonella* de carcaças de aves de um frigorífico;
- Identificar as cepas de *Salmonella* por PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase);
- Determinar *in vitro* a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos clorados comerciais (dióxido de cloro, dicloro isocianurato de sódio e ácido tricloro isocianúrico) e ácidos orgânicos (ácido cítrico, ácido láctico e ácido peracético) na inibição do crescimento de cepas padrões de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*;
- Avaliar o efeito da concentração inibitória mínima dos ácidos orgânicos mais efetivos sobre a inibição do crescimento de cepas de *Salmonella* isoladas de um frigorífico;
- Testar a concentração inibitória mínima dos ácidos orgânicos e dos compostos clorados mais efetivos sobre a redução de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* de água de *chiller* artificialmente contaminada;
- Verificar o efeito da concentração inibitória mínima dos ácidos orgânicos e dos compostos clorados mais efetivos sobre a redução de *Salmonella* spp., mesófilos totais e enterobactérias de cortes de aves artificialmente contaminados.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 AVICULTURA BRASILEIRA

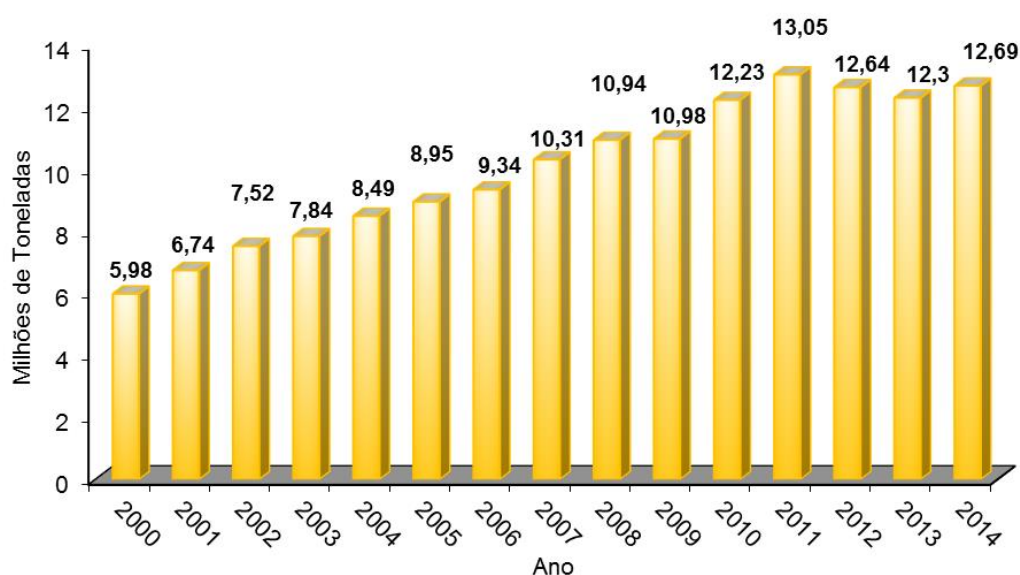
Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento. Seu bem principal, o frango, conquistou os mais exigentes mercados tornando o Brasil o terceiro produtor mundial e líder em exportação (BRASIL, 2016).

No panorama nacional, a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5 % do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Estão inclusos na cadeia produtiva do frango todos os produtores integrados, as empresas processadoras, representadas pelos abatedouros frigoríficos e as empresas exportadoras (BRASIL, 2014).

Segundo Mendes (2014), o baixo custo de produção, a sanidade animal e os programas de biossegurança se destacam na avicultura nacional. Dentre estes, o Programa Nacional de Sanidade Avícola tem como objetivo garantir a sanidade dos plantéis e os acordos sanitários. Além disso, o sistema de integração que permite implementar os programas de qualidade em todos os elos da cadeia, a flexibilidade para buscar atender as exigências dos clientes internacionais, a diversidade de produtos que pode otimizar a exportação para diferentes mercados e o desenvolvimento de tecnologia própria consolidam outras vantagens da avicultura no Brasil.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) atribui o aperfeiçoamento da produtividade avícola a fatores como qualidade, sanidade e preço, salientando que o Brasil buscou modernização e empregou instrumentos como o manejo do aviário, sanidade, alimentação balanceada, melhoramento genético e produção integrada (BRASIL, 2016).

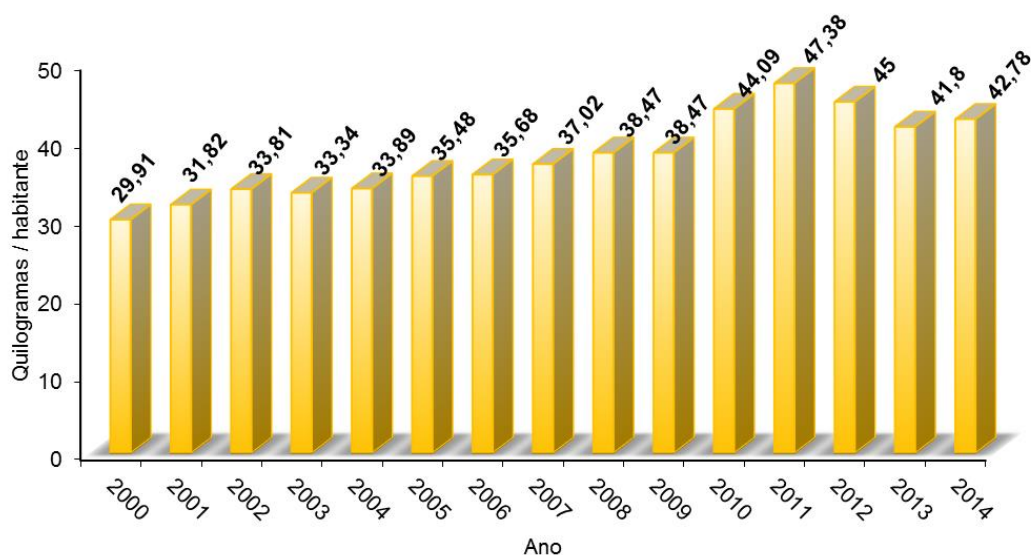
A Figura 01 ilustra a evolução da produção de carne de frango no Brasil, referenciando o período de 2000 até 2014. Observa-se que houve um aumento de 112,2% na produção de carne de frango, o qual é justificado pelo aumento do consumo nos mercados interno e externo (ABPA, 2015).



**Figura 01 – Produção de Carne de Frango (milhões de toneladas)**

Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2015)

No cenário do aumento da produção de carne de frango, enfatiza-se o aumento do consumo per capita nacional, o qual é evidenciado através da Figura 02. Referenciando o período de 2000 até 2014, o consumo per capita apresentou uma elevação de 43,03%.

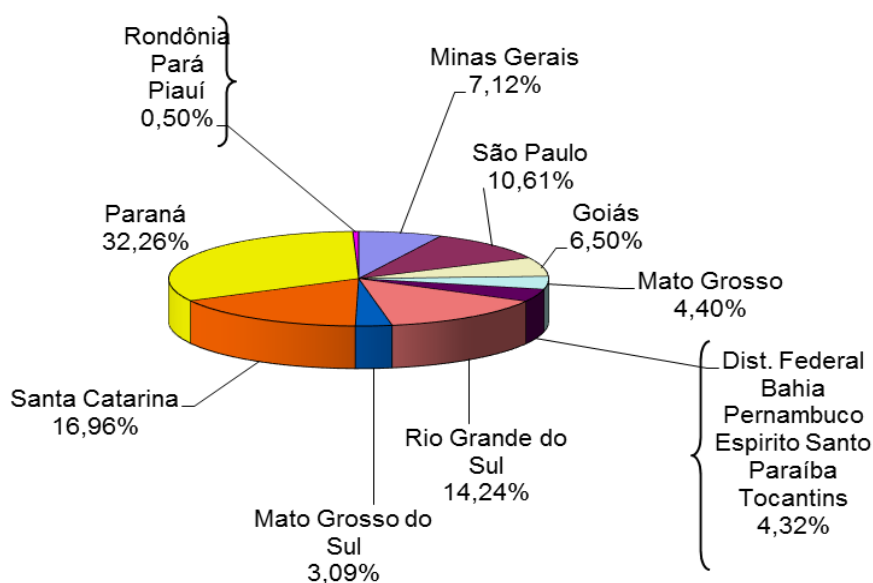


**Figura 02 – Consumo Per Capita de Carne de Frango (kg/habitante)**

Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2015)

O aumento no consumo é motivado, principalmente, pelos preços acessíveis da carne de frango quando comparada à outras fontes de proteína animal, notadamente bovina e suína e, também, pela qualidade nutricional aliada aos atributos sensoriais da carne. Tais fatores estão relacionados às mudanças nos hábitos alimentares da população, os quais são impulsionados pelo fator econômico e, também, pela busca por proteínas magras como estratégias de alimentação saudável (BARBOSA et al., 2007).

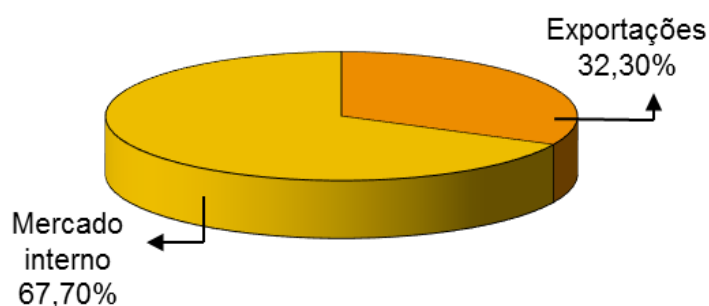
Os dados da Figura 03 demonstram os percentuais de abate que cada estado brasileiro representou no ano de 2014, sendo possível observar que a produção de carne de frango está presente em todo o território nacional. Contudo, os estados da região sul, representados pelo Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, foram os responsáveis pelo maior volume de abate nacional, totalizando 63,46%. Ainda, a região Centro-Oeste, por ser grande produtora de grãos, vem crescendo no setor e recebendo novos investimentos (BRASIL, 2015).



**Figura 03 – Abate de Frangos em 2014**

**Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2015)**

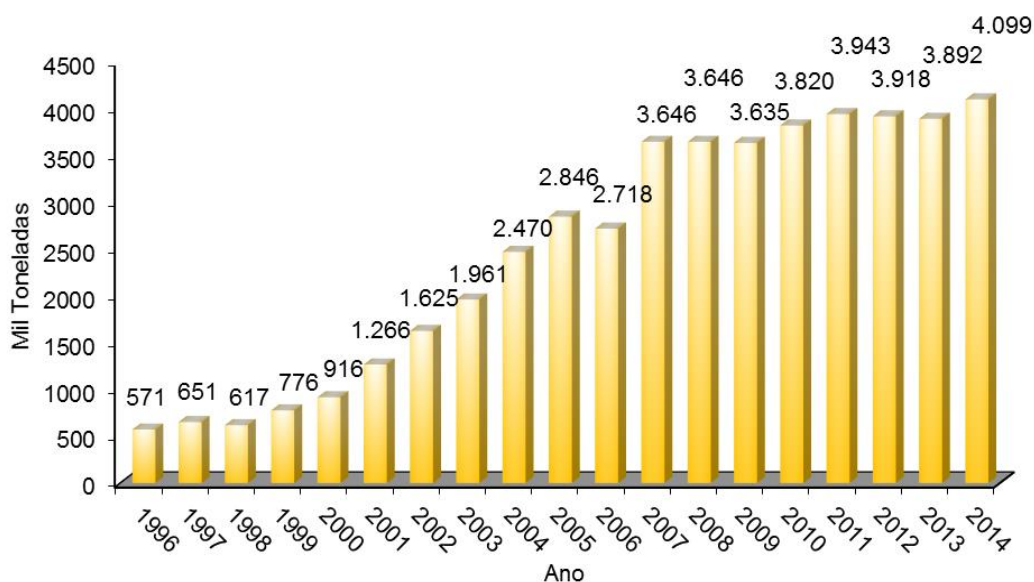
A Figura 04 ilustra o destino da produção da carne de frango brasileira, referenciando o ano de 2014, demonstrando que 32,30% da produção de carne de frango foi destinada para o mercado externo.



**Figura 04 – Destino da Produção Brasileira de Carne de Frango em 2014**

Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2015)

A produção de carne de frango no Brasil tem se consolidado nos últimos anos graças aos melhoramentos genéticos (maior rendimento e qualidade da carne), subsídios governamentais aos estabelecimentos produtores e processadores, além de investimentos em tecnologias, os quais abrangem desde as fábricas de ração, aviários até os abatedouros frigoríficos (BRASIL, 2015). Tudo isto tendo como objetivo principal a expansão das exportações, como mostra a Figura 05, a qual referencia esse cenário no período de 1996 a 2014.

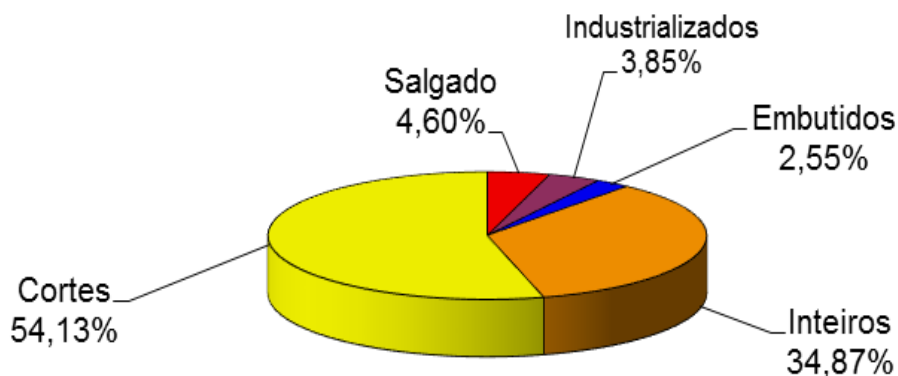


**Figura 05 – Exportações Brasileiras de Carne de Frango (mil toneladas)**

Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2015)

Nesse contexto, o aumento das exportações de carne de frango é impulsionado pela expansão de vendas para mercados já consolidados e também pela abertura de novos mercados.

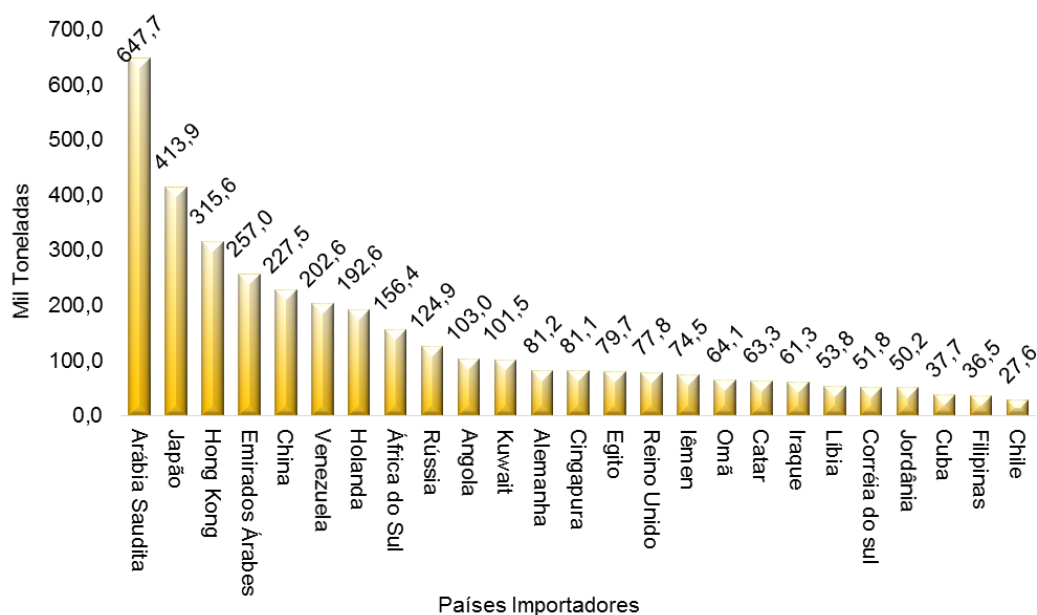
A Figura 06 ilustra os principais produtos destinados para o mercado externo, dos quais cortes e frango inteiro representam o maior volume de vendas (89%).



**Figura 06 – Exportações Brasileiras de Carne de Frango por Produto**

Fonte: Associação Brasileira de Proteína Animal (2015)

Na Figura 07 estão representados os 25 principais países importadores de carne de frango do Brasil no ano de 2014.



**Figura 07 – Os 25 Principais Importadores da Carne de Frango Brasileira em 2014 (mil toneladas)**

Fonte: Avisite (2015)

De acordo com os dados referenciados na Figura 07, Arábia Saudita, Japão, Hong Kong e Emirados Árabes representaram os maiores clientes do Brasil no ano de 2014, totalizando juntos 1.634,200 toneladas de produtos.

Logo, é notório que diante do volume crescente da produção, do consumo e da comercialização para os mercados consumidores, a preocupação dos frigoríficos brasileiros está refletida na garantia de alimentos seguros, visando cada vez mais a garantia da qualidade microbiológica e, conseqüentemente, a confiabilidade dos clientes do mercado interno e dos países importadores.

### 3.2 PROCESSAMENTO DA CARNE DE FRANGO

Após a fase de crescimento das aves nos aviários, as quais devem ser acompanhadas por equipe técnica qualificada, as mesmas são carregadas e são transportadas para o frigorífico. Na chegada ao frigorífico até o momento do abate, as aves devem permanecer em áreas de descanso sob condições ideais de temperatura e ambiente, respeitando-se os preceitos do bem-estar animal (LUDTKE, et al., 2010).

Ainda, de acordo com a Circular n° 668 (BRASIL, 2006), a qual aborda as diretrizes para preparação do Plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle para o processo de abate de aves, o fluxograma de abate e processamento de aves compreende as etapas mencionadas na Figura 08.

Cada etapa do abate é devidamente fiscalizada por fiscais federais agropecuários, os quais são representantes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, com a finalidade de atestar a qualidade sanitária dos produtos. Os fiscais examinam as áreas dos frigoríficos e verificam a aplicação dos programas de autocontrole implementados, a documentação e as condições de saúde dos animais abatidos. Baseada na avaliação dos critérios técnicos e sanitários e pautada na legislação, a inspeção federal retira da cadeia alimentar produtos que poderiam lesar a saúde, evitando a transmissão de doenças. Além disso, quando o estabelecimento não atende aos requisitos previstos, pode sofrer interdição até o cumprimento das exigências e necessidade de uma supervisão para constatar a regularidade (BRASIL, 2016).

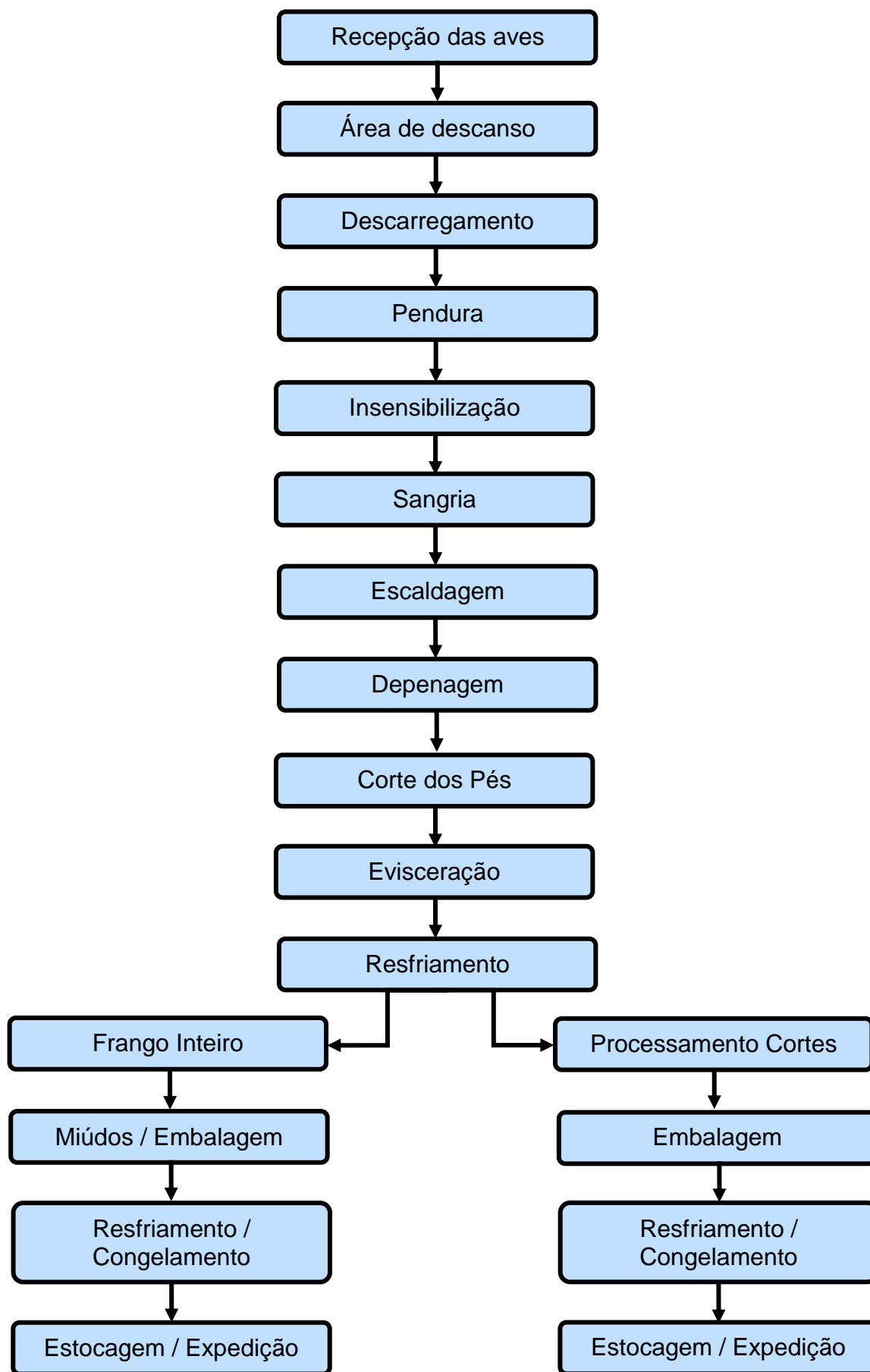
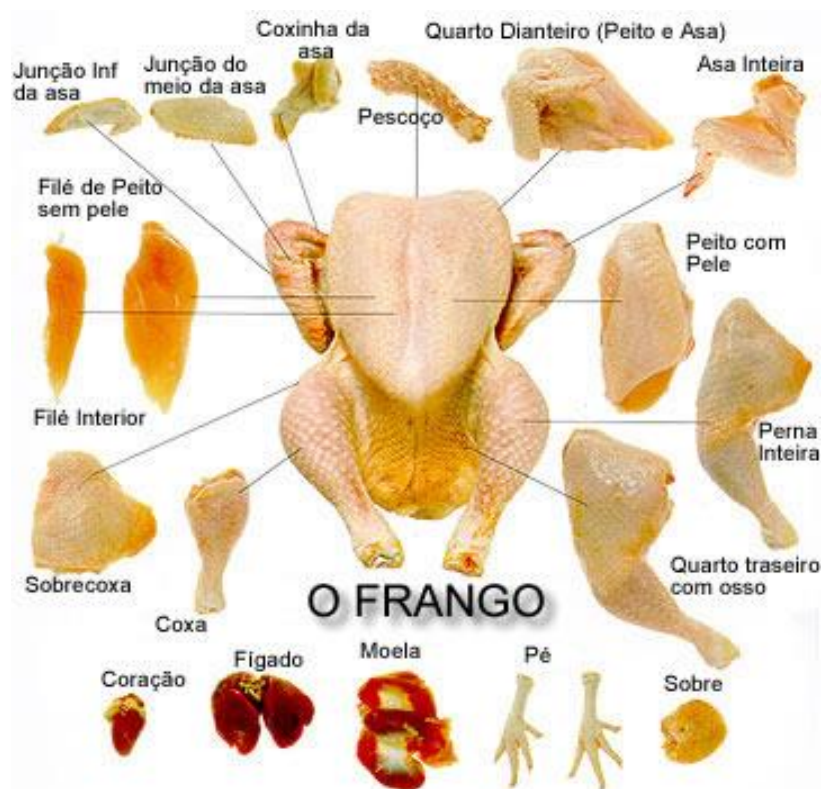


Figura 08 – Fluxograma do Abate de Aves

Fonte: Brasil (2006)



No que tange ao processamento da carne, os mercados demandam de uma variedade maior, mais segura e cada vez mais ampla de produtos finais. Com isso, atualmente há uma diversidade de cortes, miúdos e frango inteiro, os quais são desenvolvidos visando atender aos critérios requeridos pelos clientes tanto do mercado interno como do mercado externo. A Figura 09 apresenta o mapa do frango, ilustrando os principais cortes.



**Figura 09 – Mapa do Frango**

**Fonte: Brasil (2015)**

Em muitos frigoríficos, essa demanda dos mercados leva à centralização e à sofisticação da produção automatizada e à busca pela capacidade de produzir com flexibilidade e de criar produtos finais diferenciados. Neste sentido, a produção cotidiana deve ser capaz de operar sem problemas com o maior tempo de operação possível, com os melhores rendimentos que puderem ser obtidos e com um custo de propriedade previsível e o menor possível, atentando para a segurança e qualidade dos alimentos (BRASIL, 2016).

### 3.3 QUALIDADE DA CARNE DE FRANGO

A qualidade sanitária é indiscutivelmente necessária quando se trata de produzir alimentos. A regulamentação das exigências para comercialização, tanto nacional quanto internacional, é cada vez mais ampla. Neste sentido, os tratados de livre comércio entre as nações e, principalmente, o tratado que é gerido pela Organização Mundial do Comércio (OMC) são fundamentais. Além de preverem uma comercialização mais justa do ponto de vista dos países produtores de alimentos com reduções de subsídios, promove avanços no que diz respeito às normas técnicas (VIEIRA, 2008).

No Brasil, o órgão fiscalizador responsável por assegurar a sanidade animal é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dentre os seus programas, destaca-se o PNCP – Programa Nacional de Controle de Patógenos, o qual objetiva identificar a prevalência dos patógenos em produtos de origem animal produzidos pelos estabelecimentos com serviço de inspeção federal e, desta forma, monitorar e instigar os estabelecimentos a tomar ações para reduzir ou eliminar os desvios microbiológicos (BRASIL, 2003).

Os mercados importadores estão se abrindo cada vez mais aos produtos avícolas brasileiros. Logo, a produção nacional deve se focar para atender as exigências com níveis elevados de sanidade e qualidade (BRASIL, 2015).

Nesse contexto, a definição da qualidade da carne de frango depende muito das exigências impostas pelo mercado consumidor e da efetividade dos controles nas etapas da cadeia produtiva (BRIDI, 2004).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, estabelece os critérios microbiológicos para carnes resfriadas ou congeladas *in natura* de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes), sendo necessária a análise de coliformes termotolerantes, ao passo que o limite máximo para a amostra indicativa é de  $10^4$  UFC/g (se obtido por contagem em placa) ou  $10^4$  NMP/g (se obtido por metodologia do número mais provável) (BRASIL, 2001).

Os países membros da União Europeia, os quais são representados com maior expressividade pela Alemanha, Áustria, Espanha, Finlândia, Hungria, Portugal, Reino Unido e Suécia (BRASIL, 2016) preconizam a ausência de *S. Enteritidis* e *S.*

Typhimurium em carnes e miúdos de frango *in natura*. Para produtos preparados de frango as exigências sanitárias consistem de análises de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CE, 2005). Sendo que os containers, no momento da chegada ao destino, são aleatoriamente amostrados pelas autoridades europeias, ou seja, análises microbiológicas são realizadas em determinados volumes de produtos.

Já a África do Sul determina que a carne *in natura* esteja ausente de *Salmonella* spp., e a carne mecanicamente separada esteja com níveis de mesófilos, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* dentro dos limites preconizados, além de *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*, *S. Typhi* e *E. coli* O157:H7 ausentes (BRASIL, 2008).

Os países membros da União Aduaneira (Rússia, Bielorrússia e Cazaquistão) possuem exigências para vários grupos de alimentos, as quais estão discriminadas em regulamentos específicos. Para carnes e miúdos de frango *in natura* as exigências contemplam mesófilos em quantidade menor ou igual a  $10^4$  UFC/g, coliformes totais ausentes em 0,01 grama, coliformes termotolerantes ausentes em 1,0 grama, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* ausentes (TR CU, 2011; BRASIL, 2013; BRASIL, 2016).

Logo, a efetividade dos controles brasileiros nos quesitos sanitários é primordial para a permanência dos mercados já existentes e para a conquista de novos mercados importadores, sendo que após a avaliação pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, é possível a adequação dos fornecedores às exigências, assim como a negociação referente as barreiras de mercado para as empresas que não apresentam históricos de violações sanitárias.

### 3.4 MICRO-ORGANISMOS NA CARNE DE FRANGO

O frango chega ao abatedouro com uma contaminação microbiológica própria que pode ser modificada ou aumentada durante as diferentes etapas do processamento e obtenção da carne. A microbiota deteriorante se restringe às superfícies e à pele, pois as mesmas são contaminadas pela água, pelo processamento e pelo manuseio das aves. Em geral, a microbiota reflete os micro-

organismos do abate e de etapas do processamento, com uma predominância de bactérias Gram-negativas (JAY, 2005).

#### 3.4.1 *Salmonella* spp.

A *Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*. O gênero é caracterizado por bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos e em formato de bastonetes curtos (1 a 2 µm). A maioria das espécies é móvel, com flagelos peritríquios, exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* que são imóveis. A *Salmonella* fermenta a glicose, produzindo ácido e gás, porém é incapaz de metabolizar a lactose e a sacarose. A temperatura ótima de crescimento é de aproximadamente 38 °C e a temperatura mínima para o crescimento é de cerca de 5 °C. Como não formam esporos, são relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60 °C por 15 a 20 minutos. Há apenas duas espécies de *Salmonella* (*S. enterica* e *S. bongori*) que são divididas em oito grupos (FORSYTHE, 2002). Sendo que *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (RODRIGUES, 2011).

Em cada subespécie são reconhecidos diferentes sorovares, totalizando atualmente 2.610, com base na caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H) e de acordo com a espécie e subespécie, tendo a seguinte distribuição: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* (1.547 sorovares), *Salmonella enterica* subespécie *salamae* (513), *Salmonella enterica* subespécie *arizonae* (100), *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae* (341), *Salmonella enterica* subespécie *houtenae* (73), *Salmonella enterica* subespécie *indica* (13), *Salmonella bongori* (23), os quais não reconhecem a espécie proposta *Salmonella subterrânea*, tendo sido a mesma inserida como sorovar da espécie *S. bongori* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos é um problema relevante de saúde pública que não deve ser tolerado, pois a maioria dos sorotipos desse gênero é patogênico ao homem, apresentando diferentes sintomas em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro (SHINOHARA et al., 2008).

A carne de aves e seus derivados configuram-se como um dos principais alimentos envolvidos em surtos de infecções alimentares por *Salmonella* spp. em decorrência do preparo inadequado e da contaminação cruzada em cozinhas domiciliares e industriais. Sendo que a contaminação das carcaças de frango pode acontecer pela presença do micro-organismo no ambiente de criação das aves e, conseqüentemente, pela disseminação às carcaças durante as operações de abate, mesmo quando os abatedouros são dotados de boas práticas de higienização e processamento (COLLA, 2012).

Segundo Robinson (2013), *S. Enteritidis* é o sorotipo mais comum de *Salmonella* e, também, o mais frequentemente associado com aves. O aumento da sua prevalência em produtos avícolas fez da *S. Enteritidis* uma séria questão de segurança na década de 70. Antes disso, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* foram os sorotipos endêmicos em criações de aves, mas foram minimizados por meio de programas de erradicação agressivos. A *S. Enteritidis* infecta o trato gastrointestinal das aves, sendo transmitida de ave para ave de várias maneiras, sendo a mais comum através do material fecal, quando as aves ciscam em fezes contaminadas. A *Salmonella* é transmitida do trato intestinal para a carne quando as aves contaminadas são abatidas. Os ovos podem ser contaminados pela casca, por material fecal eliminado durante a postura ou também internamente, pois a *S. Enteritidis* contamina os ovários das galinhas (transmissão transovariana).

Paião et al. (2013) relatam que a presença de *Salmonella* no trato intestinal, na pele das aves e entre as suas penas pode causar a contaminação de carcaças durante o abate e processamento e possivelmente isso é responsável pela introdução desse micro-organismo nos abatedouros.

Existem vários programas experimentais em andamento para detectar e reduzir a ameaça deste sorotipo na carne de frango e nos ovos, sendo que este micro-organismo tem seu monitoramento definido através de legislações específicas de países importadores, como por exemplo da União Europeia (CE, 2005).

*S. Typhimurium* é o segundo sorotipo mais associado à doenças transmitidas por alimentos e o terceiro mais frequentemente identificado em frangos. Este sorotipo tem se apresentado muito resistente aos antibióticos, o que torna sua eliminação dos alimentos muito difícil. Nos Estados Unidos, surtos associados com *Salmonella Typhimurium* envolveram desde alimentos comuns como carne bovina,

carne de porco, melões, pasta de amendoim, tomates, água, até itens exóticos como rãs africanas (SOARES, 2013).

S. Heidelberg é o quinto sorotipo de *Salmonella* mais associado à doenças transmitidas por alimentos e o segundo mais associado com aves de criação e questões de saúde humana de acordo com um relatório recente do FSIS (Food Safety and Inspection Service). S. Heidelberg foi a causa de um surto ocorrido em março deste ano nos Estados Unidos ligado à carne de frango. O surto afetou 128 pessoas em 13 estados (SOARES, 2013).

Devido ao fato da contaminação por *Salmonella* ser uma preocupação nos frigoríficos avícolas, no ano de 2003 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabeleceu o “Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus”. O programa objetiva verificar a prevalência de *Salmonella* spp. nos produtos avícolas, formar um banco de dados para análise dos índices de contaminação nos produtos avícolas, estabelecer padrões quantitativos de aceitabilidade da contaminação dos produtos avícolas, monitorar constantemente o nível de contaminação por este patógeno em estabelecimentos de abate de aves e aumentar as garantias de inocuidade dos produtos avícolas no mercado interno e externo (BRASIL, 2003).

O sistema de inspeção do programa é realizado em conjunto com as práticas de garantia da qualidade, baseado nos princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), no Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e na Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que conferem um controle minucioso sobre o processo (BRASIL, 2003).

No que tange à segurança microbiológica da carne de frango relacionada à *Salmonella* spp., salienta-se que no período de 2000 até 2015, foram notificados pela Secretaria de Vigilância em Saúde 10.666 casos de surtos transmitidos por alimentos. Destes, 235 surtos, ou seja, 2,2%, foram relacionados à carne de aves *in natura*, processados e miúdos, sendo que, dos agentes etiológicos, *Salmonella* spp. representou 14,4% (BRASIL, 2016). Logo, dentro de um período de 15 anos, é imperioso destacar que no Brasil os dados revelam que há uma subnotificação dos surtos, principalmente quando comparados aos dados de países como Estados Unidos, por exemplo.

### 3.4.2. Mesófilos Totais

Vários grupos ou espécies de micro-organismos podem ser utilizados na avaliação da qualidade dos alimentos. Esses micro-organismos, conhecidos como indicadores, quando presentes em números elevados, podem fornecer informações gerais sobre as condições durante o processamento, além de indicarem a qualidade sanitária do alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A maioria dos micro-organismos que se encontra nas aves vivas são os aeróbios mesófilos, e poucos conseguem se desenvolver em temperaturas inferiores a 7 °C. Sua contagem tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos e, quando presente em número elevado, indica falhas durante a produção (CARDOSO et al., 2005).

O grupo dos mesófilos está frequentemente associado às exigências sanitárias de vários países importadores de carnes de aves. Contagens elevadas de mesófilos nos alimentos perecíveis pode indicar abuso durante o armazenamento em relação ao binômio tempo / temperatura. Além disso, a maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, sendo que uma alta contagem de mesófilos significa a ocorrência de condições para que esses patógenos se multiplicassem (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Circular nº 12 de 13/04/2007, estabeleceu a necessidade de análises de contagens de mesófilos e enterobactérias em carcaças de frango como forma de verificar que os frigoríficos não utilizam outros descontaminantes de carcaças que não o cloro. Logo, a redução da carga microbiana nas carcaças não pode ser maior do que 2 logs UFC/g antes e depois do sistema de resfriamento. Resultados com reduções superiores a 2 logs UFC/g são considerados como não conformes, denotando irregularidades no sistema de resfriamento (BRASIL, 2007).

### 3.4.3. Enterobactérias

A família *Enterobacteriaceae*, tendo como seu principal representante *Escherichia coli*, além de outras bactérias patogênicas para o homem e para os animais, é uma das famílias bacterianas mais importantes. Estes patógenos constituem a principal causa de infecção intestinal em muitos países (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

As bactérias pertencentes a este grupo são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água, plantas, frutas, vegetais, carnes, ovos, grãos, animais, insetos e no homem. Várias espécies são patogênicas para plantas e animais, respondendo por perdas econômicas expressivas na agricultura e na indústria de alimentos. Várias enterobactérias são também patogênicas para o homem, representando risco para a saúde pública em todo o mundo. A *Salmonella* spp. é a mais importante, sendo as aves, os ovos, os ovinos e os suínos os principais veículos de salmoneloses para humanos (SILVA et al., 2010).

As enterobacteriáceas apresentam ou produzem um gama de fatores de virulência. A maioria destes fatores é expressa pelas variedades patogênicas de *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia*. Podem causar infecções intestinais e extra-intestinais, sendo que cada espécie ou gênero possui um comportamento com relação à capacidade de causar infecção (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

*Escherichia coli* é a espécie predominante entre os diversos micro-organismos anaeróbios facultativos que fazem parte da flora intestinal de animais de sangue quente. São bacilos Gram-negativos, não esporulados e capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A presença de *E. coli* em alimentos é indicativo de contaminação microbiana de origem fecal, revelando condições higiênicas insatisfatórias. Ainda, as diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para o homem e para os animais (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Em relação à contaminação das carcaças de frango por enterobactérias, esta ocorre durante o processamento, onde há um maior envolvimento das bactérias retidas na camada líquida da pele do frango. A contaminação das aves ocorre por exposição ao ambiente de criação, abate e processamento. Esses micro-organismos são encontrados na superfície externa, espaço interdigital, tegumentos cutâneos,



aparelho digestivo e respiratório. Portanto, a contaminação desses alimentos se dá por diversos processos durante a produção e manipulação do animal (SILVA, 2002).

### 3.5 ETAPAS DE ABATE E O CONTROLE DE *Salmonella* spp.

O abate das aves é estabelecido conforme o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) e Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves (Portaria nº 210). Nestes regulamentos são tratadas questões relacionadas ao pré-abate e ao abate propriamente dito (BRASIL, 2014). Segundo Van der Fels-Klerx et al. (2008), a prevalência de *Salmonella* sobre as aves pode aumentar durante o transporte e o abate, mas pode ser reduzida através da implementação de várias intervenções, até o final do abate e da preparação. Algumas etapas como escaldagem, depenagem, evisceração e resfriamento das carcaças podem aumentar os níveis de contaminação. Intervenções de controle microbiológico (separação de lotes contaminados e, quando permitidos, sistemas de descontaminação de carcaças) podem ser utilizadas no abate, mas apresentam resultados variáveis e não eliminam a contaminação (BOLDER, 2007).

A escaldagem envolve a imersão das aves em um líquido quente, usualmente água, para facilitar a remoção das penas e cutículas. O processo também reduz *Salmonella*, sujidades e fezes das carcaças (BUNCIC, SOFOS 2012).

Yang, Li e Johnson (2001) enfatizaram em seu estudo que as reduções de *Salmonella* durante a escaldagem são geralmente maiores quanto maior for a temperatura da água. Além disso, estes autores, ao avaliarem a sobrevivência e a morte de *S. Typhimurium* e *Campylobacter jejuni* da pele das aves e da água durante a escaldagem e resfriamento, observaram que escaldagens a 60 °C reduziram em 2 logs a mais as populações do que a 50 °C, enquanto que as reduções foram similares em escaldagens de 55 ° e 60 °C.

Outro fator que interfere no processo de escaldagem é o valor de pH, níveis de pH alcalino (9,0) ou ácido (3-4) reduzem a resistência da *Salmonella* ao calor, enquanto que a matéria orgânica presente no tanque associada com o ácido úrico derivado das próprias fezes das aves reduz e mantém o pH em valores próximos à

neutralidade, favorecendo o crescimento de *Salmonella*. No geral, a escaldagem pode ter somente um efeito mínimo sobre a eventual carga microbiana das carnes de aves.

Quanto ao processo de depenagem, as depenadeiras automáticas auxiliam no controle da contaminação cruzada entre as carcaças. De acordo com o Comitê Consultivo Nacional sobre Critérios Microbiológicos para Alimentos – NACMCF (1997) citado por Buncic e Sofos (2012), durante a depenagem das aves células microbianas podem ser aprisionadas nos folículos da carcaça e, portanto, serem protegidas da remoção ou inativação pela lavagem ou descontaminação. Substâncias como cloro, ácido acético e peróxido de hidrogênio podem ser utilizados como compostos de lavagens químicas durante a depenagem (BOLDER, 2007).

Na etapa de evisceração, um cuidado importante é evitar danos no sistema gastrointestinal das aves, o que pode resultar em aumento da contaminação fecal das carcaças. Além das carcaças, o vazamento do conteúdo intestinal contamina equipamentos, trabalhadores e inspetores e serve como fonte de contaminação cruzada (BUNCIC; SOFOS, 2012). Os equipamentos e carcaças podem ser pulverizados continuamente com água durante a evisceração para remover material orgânico, minimizar a aderência de células microbianas e reduzir a contaminação. Adicionalmente, deve haver a regulagem e manutenção dos equipamentos, uso de cloro para lavagem das carcaças, elevados padrões de higiene dos funcionários, lavagem e sanitização contínua da linha de evisceração e lavagem final das carcaças antes do resfriamento (WHO, 2009).

Em relação ao sistema de resfriamento, Bersot (2002) destaca que este consiste de uma etapa importante no processo tecnológico do abate de aves, sendo um dos seus objetivos a diminuição da temperatura das carcaças através da imersão das aves em água gelada, diminuindo, dessa forma, a velocidade de multiplicação da microbiota existente nas mesmas. Ainda, as reduções podem ser reforçadas pela adição de cloro ou outros compostos com ação antimicrobiana.

Von Rückert et al. (2009) encontraram menor incidência de *Salmonella* spp. na saída do sistema de resfriamento, e no estudo enfatizaram que o resfriamento parece ter sido o único ponto que exerceu controle sobre *Salmonella* spp., associando o resultado às baixas temperaturas da água (4 °C) e da carcaça (5 °C a 10 °C) e pela alta concentração de cloro (3,0 a 4,0 mg/mL).

Nesse panorama, quando se concentra nos métodos de controle de *Salmonella* spp. no abate de aves, o uso de múltiplas abordagens oferece o melhor meio para garantir um produto final seguro.

### 3.6 COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

Com a finalidade de reduzir ou eliminar as contagens de patógenos, especialmente *Salmonella*, em produtos cárneos após o abate, muitos tratamentos físicos e antimicrobianos têm sido sugeridos. Os mais importantes são os tratamentos térmicos, lavagens com compostos oxidantes como hipoclorito, ácido peracético e peróxido de hidrogênio, entre outros, aplicação de bacteriocinas ou bactérias ácido lácticas, antimicrobianos naturais extraídos de especiarias e lavagem com ácidos orgânicos (ácido láctico, acético, cítrico, málico e propiônico) (LEISTNER, 2000).

Leistner (2000) fez uma abordagem sobre a tecnologia de barreiras mencionando que essa tecnologia defende a deliberada combinação de técnicas de preservação existentes e/ou novas que estabelecem uma série de fatores de preservação que aumentam a estabilidade microbiológica e a qualidade sensorial dos alimentos, bem como suas propriedades nutricionais e econômicas.

Logo, dentre as abordagens para reduzir a prevalência de *Salmonella* spp. em aves destinadas ao consumo humano, menciona-se o uso de ácidos orgânicos e de compostos clorados, sendo referenciados abaixo alguns estudos sobre a efetividade destes compostos.

#### 3.6.1 Ácidos Orgânicos

De acordo com Hinton e Corry (1999), referenciados por Mani-López, García e López-Malo (2012), a aplicação de ácidos orgânicos sobre a superfície de carnes é um procedimento comum. Tratamentos com ácidos são de baixo custo, simples e rápidos e têm mostrado eficiência em muitos casos. Além disso, a maioria dos

ácidos não têm o seu limite máximo de ingestão diária aceitável para humanos estabelecido. Estas características tornam interessante o uso destes produtos em produtos cárneos, mas a possibilidade de mudanças sensoriais como cor e sabor devem ser consideradas (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012).

O ácido cítrico é um ácido hidroxí tricarbóxico, solúvel em água. Tanto o ácido cítrico quanto os seus sais têm demonstrado ação para o controle de patógenos de carnes de aves frescas e processadas, mas o seu uso é potencialmente limitado pelos possíveis impactos sensoriais negativos e necessidade de manter o pH baixo para a ótima atividade antimicrobiana (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012).

O ácido láctico é um dos ácidos mais amplamente distribuídos na natureza e um dos principais ácidos formados durante os processos fermentativos naturais. É considerado como substância *Generally Recognized as Safe* (GRAS) para a utilização em alimentos nos Estados Unidos. Atribui-se ao ácido láctico a capacidade de reduzir a carga microbiana inicial de carnes por meio de um efeito bactericida imediato e um efeito bacteriostático que atuaria por tempo prolongado (PRASAI et al., 1992 apud SCANDOLARA et al., 2012).

O ácido peracético apresenta eficiência frente a bactérias esporuladas, leveduras, fungos e vírus. É decomposto a elementos inofensivos, resultando apenas em traços de água e ácido acético. Pode ser utilizado no tratamento de carcaças através da pulverização ou em sistemas contínuos. Este uso é permitido pela Food and Drug Administration (MASSAGUER, 2005).

Bauermeister et al. (2008) verificaram os níveis necessários e eficazes de cloro e ácido peracético para diminuir *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. quando usados no resfriamento de aves e avaliar a qualidade das carcaças. Como resultados, estes autores evidenciaram que ácido peracético na concentração de 0,0025 % foi efetivo para reduzir *Salmonella* spp. em 91,8 %. Ainda, que o ácido peracético pode ser utilizado no resfriamento de aves como uma estratégia de intervenção efetiva para diminuir a incidência de *Salmonella* Typhimurium e *Campylobacter jejuni*. Além disso, o ácido peracético pode aumentar o *shelf life* dos produtos nas instalações de processamento sem comprometer as propriedades organolépticas dos produtos.

Sobre o mecanismo de ação dos ácidos orgânicos, há diferentes suposições. Russel (1992) explica que a forma não dissociada do ácido seria

lipossolúvel e nessa forma teria capacidade de atravessar de forma passiva a membrana celular. No interior da célula, o ácido se dissociaria alterando o pH citoplasmático, modificando o gradiente de prótons e a carga elétrica com o exterior celular. Isso interferiria no sistema de transporte de aminoácidos e fosfatos além de inativar enzimas. Outra consequência seria o aumento da pressão osmótica celular devido aos mecanismos de compensação de carga elétrica, aumentando os níveis de sódio, potássio ou glutamato e a força iônica intracelular, provocando um aumento da pressão mecânica sobre a parede do micro-organismo, o que faria com que essa se rompesse.

Lues e Theron (2011) descrevem que a atividade bactericida dos ácidos orgânicos ocorre devido às suas formas não dissociadas, as quais têm como alvo as funções metabólicas dos micro-organismos, tais como a produção de proteína, a inibição de ATP e um aumento na pressão osmótica.

Silva (1998) enfatiza que a atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos depende da redução do pH, da mínima dissociação do ácido e da toxicidade da molécula. Os ácidos fracos são mais eficientes do que os ácidos fortes, visto que os ácidos fracos são capazes de acidificar o interior da célula. São necessários valores de pH inferiores a 5,5 para reduzir o crescimento microbiano. Salienta ainda que o efeito do tratamento com ácidos orgânicos depende da concentração do ácido, do tempo de aplicação, da temperatura e do método de aplicação.

### 3.6.2 Indicações de Uso dos Ácidos Orgânicos

Mesmo com o estudo de novas metodologias de intervenção para descontaminação de carcaças, o emprego de ácidos orgânicos, ou mesmo de outras substâncias antimicrobianas que poderiam reduzir os riscos provenientes da contaminação por micro-organismos patogênicos, é prática não permitida no Brasil. Já nos Estados Unidos existem legislações específicas que permitem, em concentrações limitadas, o uso de ácidos orgânicos como descontaminantes de carcaças, desde que seu uso seja aprovado pelas autoridades sanitárias competentes (BOLDRIN, 2012).

A FSIS (Food Safety and Inspection Service), a qual é a agência reguladora de saúde pública do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos responsável por garantir o fornecimento de carnes bovinas, suínas, aves e ovos seguros, saudáveis e corretamente embalados e rotulados, através da Diretiva nº 7120.1, permite o uso de ácido láctico como descontaminante de carcaças de aves em concentração de no máximo 5%, além de misturas de ácidos cítrico, láctico e acético em concentração máxima de 2,5%. Autoriza ainda o uso de ácido peracético na concentração máxima de 220 ppm na água de escaldagem, lavagem, aspersão ou resfriamento de carcaças de aves ou suas partes (FSIS, 2012).

Na União Europeia, o uso de tratamentos de descontaminação é permitido, desde que não substitua as práticas de higiene para obtenção de alimentos e não sejam utilizados descontaminantes químicos, como os ácidos orgânicos. Outras tecnologias de intervenção pós-abate podem ser utilizadas, porém é obrigatória a permissão para o seu uso (BOLDRIN, 2012).

Ainda na União Europeia, o uso de ácido peracético é permitido como sanitizante e desinfetante nos termos de regulamentos específicos para tais finalidades. As aplicações das soluções de ácido incluem: produtos biocidas de higiene humana, desinfetantes de áreas públicas e privadas e de áreas de saúde, produtos biocidas de higiene veterinária, desinfetantes de áreas de alimentação, desinfetantes de água de bebida, conservantes utilizados em sistemas de resfriamento e processamento de líquidos. Nos Estados Unidos da América, os perácidos têm sido amplamente utilizados como sanitizantes e desinfetantes, incluindo: instalações e equipamentos agrícolas (por exemplo, aviários e gaiolas de aves), instalações de manipulação de alimentos, instalações comerciais, institucionais e industriais, instalações residenciais e de acesso público, instalações e equipamentos médicos. Além disso, os perácidos são permitidos para uso em várias fases do processamento de carne vermelha e de produtos de aves (EFSA, 2014).

A European Food Safety Authority (EFSA), através de estudos preliminares, avaliou o uso do ácido láctico como descontaminante de carcaças de aves em concentrações que variaram de 1 a 2,5%. Contudo, até o momento são apenas considerações de uso, não havendo nenhuma publicação oficial que autorize o seu uso (EFSA, 2006).

Em relação ao ácido peracético, a EFSA elaborou um estudo relacionando a toxicidade e a efetividade de misturas que contém ácido peracético como ingrediente ativo na redução de patógenos de carcaças e carne de aves. Para tratamentos por *spray* em carcaças quentes, as concentrações recomendadas foram de 400 a 700 ppm durante um tempo de exposição de 10 segundos. Para tratamentos por imersão de carcaças quentes ou partes, a concentração recomendada foi de 2000 ppm durante um tempo de exposição de 3 minutos. Para tratamentos de imersão em resfriadores, a recomendação foi de 230 ppm durante um tempo de exposição de 1 a 2 horas. E para o tratamento de imersão de carcaças refrigeradas ou partes, a recomendação foi de 2000 ppm durante um tempo de exposição de 3 minutos (EFSA, 2014).

### 3.6.3 Compostos Clorados

Os compostos clorados são descontaminantes químicos tradicionais e podem ser usados e aplicados em diferentes formas. A ação antimicrobiana dos compostos clorados está relacionada à liberação do ácido hipocloroso em solução aquosa, que penetra através da membrana celular e oxida os grupos sulfidrílicos de enzimas importantes da via glicolítica (ANDRADE, 2008).

Kuana (2009) destaca que o efeito bactericida do cloro é assegurado em faixas de pH neutro e ácido (pH de 5 a 7). Ele tem uma ação rápida na eliminação de vírus, bactérias, leveduras, algas e fungos sendo relativamente ineficiente contra esporos.

Compostos clorados têm a capacidade de inibir determinados processos enzimáticos vitais no organismo bacteriano através da oxidação dos grupos sulfídricos dos aminoácidos presentes nas enzimas das mesmas (NASCIMENTO, 2013).

Os desinfetantes clorados são comercializados como hipoclorito de sódio, de cálcio ou como dióxido de cloro, sendo que os desinfetantes a base de dióxido de cloro são usados para a desinfecção da água e como desinfetantes em abatedouros avícolas (RUI et al., 2011).

Entre as desvantagens dos compostos clorados mencionam-se as características de serem corrosivos e a liberação de odor muito forte. Tanto concentrado ou diluído, o cloro é considerado instável e afetado pelo calor e luminosidade (KUANA, 2009).

Nos Estados Unidos, o cloro tem sido utilizado historicamente como um antimicrobiano comum para a prevenção de contaminação cruzada em carcaças em sistemas de resfriamento por imersão e ao longo de toda a planta de processamento de aves (MCKEE, 2011 citado por NAGEL et al., 2013). No entanto, dependendo da quantidade de matéria orgânica presente na água de resfriamento, o cloro reage com essa matéria orgânica e perde parte de sua funcionalidade.

No Brasil, a Portaria nº 210, a qual aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves, menciona que “a água de renovação do sistema de pré resfriamento por imersão pode ser hiperclorada, permitindo-se no máximo 5 ppm de cloro livre” (BRASIL, 1998, p.10).

Compostos organoclorados são menos suscetíveis às influências adversas da matéria orgânica, além de serem mais estáveis, menos irritantes e menos corrosivos. Entre os compostos clorados orgânicos estão as cloraminas, o ácido diclorocianúrico e o ácido triclorocianúrico (MASSAGUER, 2005).

Dicloro isocianurato de sódio e ácido tricloro isocianúrico são exemplos de cloros orgânicos passíveis de utilização por apresentarem uma estrutura química estável, reagirem lentamente com a matéria orgânica presente na água, o que leva a uma liberação mais lenta do ácido hipocloroso, permanecendo mais efetivos na capacidade de desinfecção. Além disso, o dicloro isocianurato de sódio é altamente solúvel em água, possui baixíssimo teor de sólidos insolúveis e na reação com a água, não altera o pH da água de maneira significativa. Quando reage com a água, formam-se soluções de ácido hipocloroso e isocianurato de sódio (BRASIL, 2015).

O ácido tricloro isocianúrico, por sua vez, é pouco solúvel em água, possui baixíssimo teor de sólidos insolúveis e na sua reação com a água, altera o pH da água de maneira significativa para baixo. Quando reage com a água formam-se soluções de ácido hipocloroso e de ácido isocianúrico (BRASIL, 2015).

Os compostos clorados dicloro isocianurato de sódio e o ácido tricloro isocianúrico possuem o mesmo mecanismo de ação, sendo que em solução aquosa há a liberação de ácido hipocloroso, em sua forma não dissociada, que apresenta capacidade de penetrar na célula bacteriana e destruí-la (DOMINGUES, 2015).



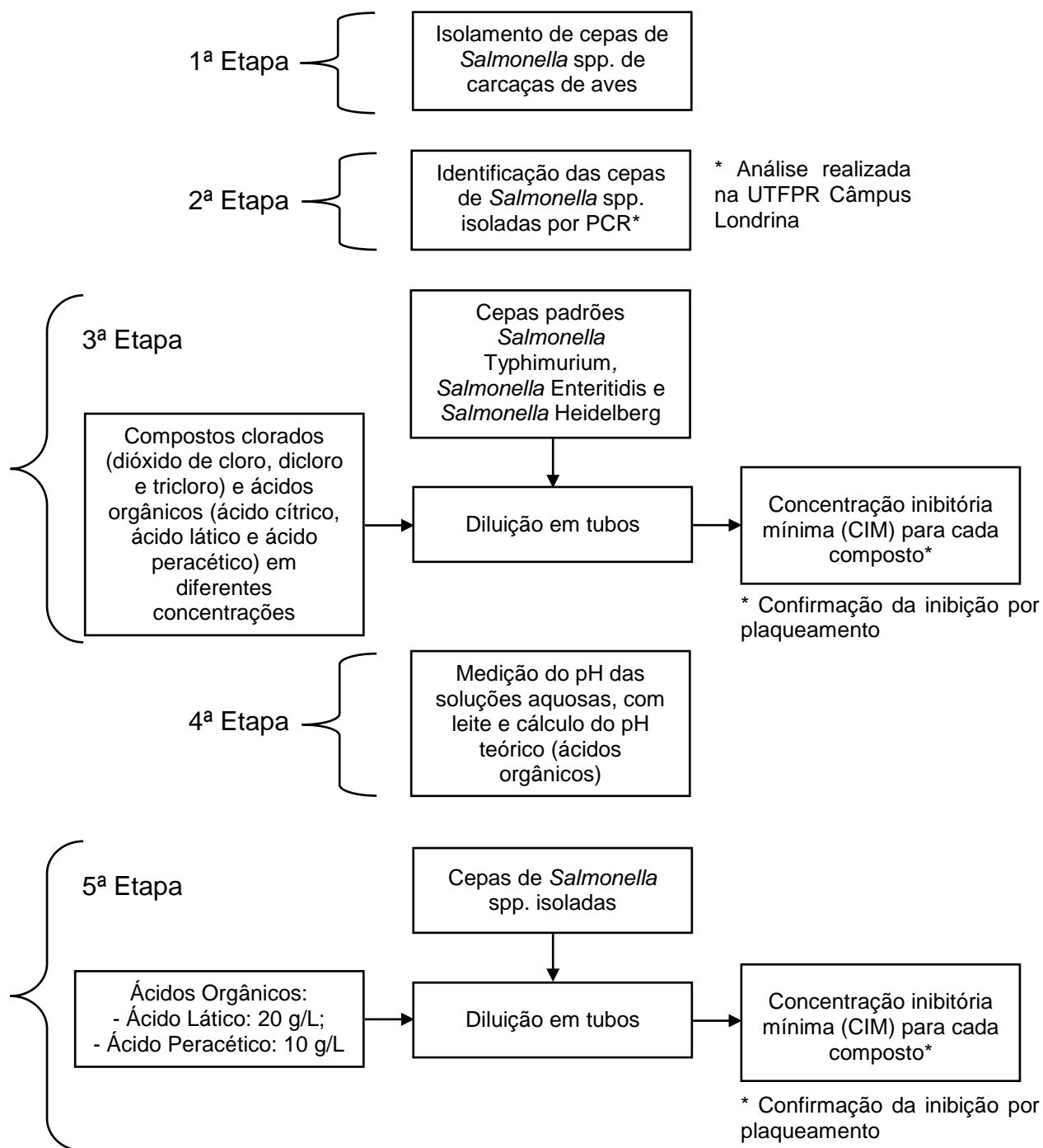
O dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) é um poderoso oxidante e desinfetante universal com aprovações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Food and Drug Administration (FDA) e governo do Reino Unido para muitos de seus usos. O dióxido de cloro é diferente do cloro e de outros compostos clorados que são usados para os mesmos fins. Possui um poder oxidante de 2,6 vezes superior ao cloro, sendo sua atuação apenas por oxidação e, diferentemente do cloro, não se combina com a matéria orgânica existente, evitando assim a formação de compostos nocivos à saúde como, por exemplo, os trihalometanos (THMs) que são cancerígenos (BRASIL, 2015)

Segundo Jaculi (2013), o dióxido de cloro, na maioria das vezes, reage através do mecanismo de transferência de elétrons atacando a membrana celular, penetrando, desidratando e, por fim, oxidando os componentes internos da célula microbiana sem causar efeito tóxico como a maioria dos componentes clorados.

Diante do exposto, destaca-se a necessidade de testar novas estratégias de intervenção nos frigoríficos de abate de aves e dentre elas, o uso de ácidos orgânicos e compostos clorados, visando a redução da contaminação de carcaças de frango e a consequente mitigação do risco potencial de transferência de micro-organismos patogênicos para os humanos, objetivando a saúde do consumidor.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas realizadas no trabalho seguiram o planejamento experimental ilustrado na Figura 10:



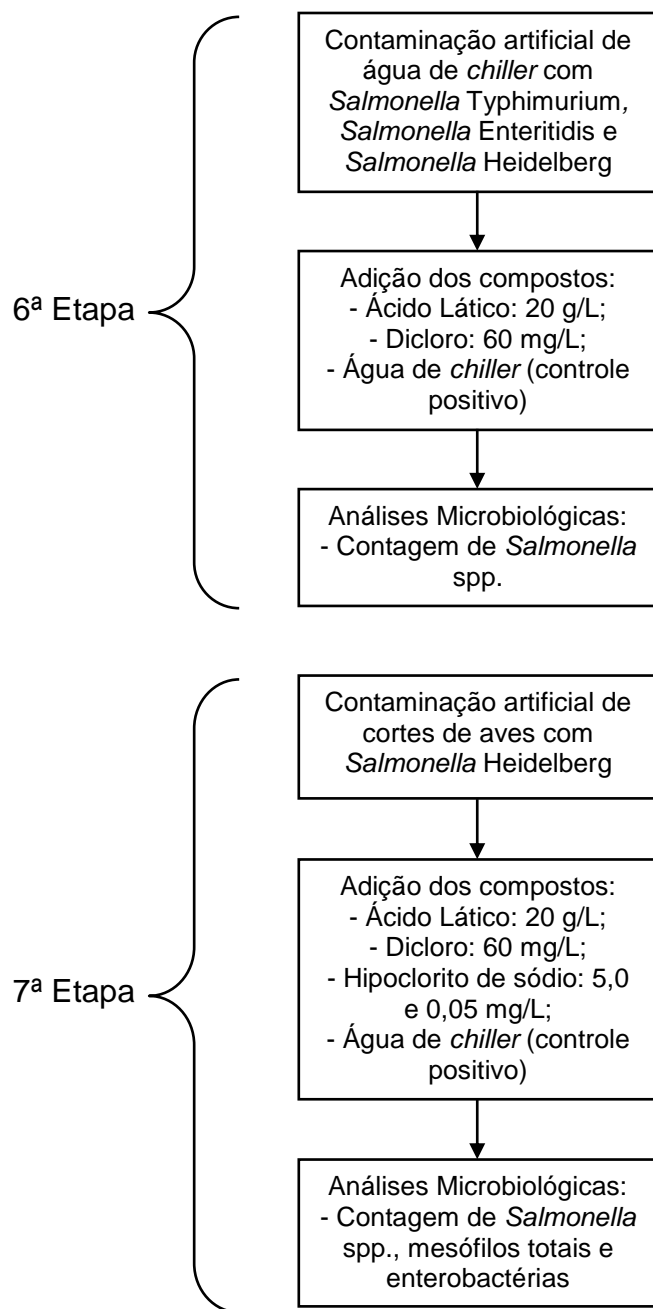


Figura 10 – Planejamento Experimental

#### 4.1 ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp. DE CARÇAÇAS DE FRANGO

O isolamento das cepas de *Salmonella* spp. a partir de carcaças de frango foi realizado no período de junho a setembro de 2014 no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do frigorífico objeto do estudo, o qual se localiza no oeste

do estado de Santa Catarina. O frigorífico se caracteriza pela capacidade diária de abate de aproximadamente 128 mil aves e processa frangos com aproximadamente seis (6) semanas de idade. O frigorífico em questão opera com Serviço de Inspeção Federal, com sistema de APPCC implantado, conforme requisitos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006) e controle de *Salmonella* em carcaças de frangos, de acordo com os requisitos oficiais (BRASIL, 2003).

A realização das quatro etapas sucessivas necessárias para a detecção de *Salmonella* spp. (pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento e confirmação bioquímica e sorológica) seguiram a metodologia de referência ISO 6579:2002 - Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method for detection of *Salmonella* spp. Para tanto, inicialmente realizou-se a pesagem em saco estéril de  $25 \text{ g} \pm 1,25 \text{ g}$  (5 %) de amostra (porções de várias regiões da carcaça) e acrescentou-se 225 mL de água peptonada tamponada. A mistura foi homogeneizada por 30 segundos a 2 minutos e incubada a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $18 \pm 2$  horas.

A etapa de enriquecimento seletivo consistiu em pipetar alíquotas de 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas para tubos contendo 10 mL de caldo rappaport-vassilliadis com soja (RVS). Os tubos foram agitados e incubados a  $41,5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  em banho-maria, por  $24 \pm 3$  horas. Posteriormente foram pipetadas alíquotas de 1 mL das amostras pré-enriquecidas para tubos contendo 10 mL de caldo Muller-Kauffman de Tetracionato de Novobiocina (MKTTn). Os tubos foram agitados e incubados a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 3$  horas.

Após a incubação do caldo RVS, as superfícies das placas de petri de ágar Rambach e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) foram estriadas com alças descartáveis estéreis de 10  $\mu\text{L}$ . O mesmo procedimento foi realizado para os tubos incubados com caldo MKTTn. Todas as placas foram incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 3$  horas. Após a incubação, foram selecionadas as colônias suspeitas, sendo que em ágar Rambach as colônias apresentaram-se na cor rosa intenso ou vermelho. Em ágar XLD as colônias típicas apresentaram-se pelo centro negro e um halo levemente transparente de cor rosa devido a mudança de cor do indicador de pH (vermelho de fenol) presente no meio.

Para a confirmação foram selecionadas de cada placa uma colônia considerada típica ou suspeita e, em seguida, quatro colônias caso a primeira colônia seja negativa. As colônias selecionadas foram estriadas com alças

descartáveis sobre a superfície das placas de ágar nutriente. As placas foram incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 3$  horas.

A partir das colônias isoladas em ágar nutriente, foram estriadas as colônias selecionadas sobre a superfície de tubos de ágar nutriente semissólido. Os tubos foram incubados a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 3$  horas.

As confirmações bioquímicas foram realizadas a partir das colônias isoladas em placas de ágar nutriente. Para tanto, utilizando-se fio de inoculação, foram inoculados os meios específicos com cada uma das culturas obtidas das colônias selecionadas e realizadas como bateria mínima para identificação de *Salmonella*, as seguintes provas bioquímicas: ágar TSI, produção de H<sub>2</sub>S, ágar uréia, caldo Lisina descarboxilase, detecção de  $\beta$  galactosidase, Teste de Voges-Proskauer, Reação de Indol.

As etapas de confirmação sorológica e sorotipagem foram iniciadas a partir da eliminação de cepas auto aglutináveis. Para tanto, em uma lâmina de vidro, com o auxílio de alça descartável, adicionou-se uma gota de solução salina 0,85 %. Em seguida, dispersou-se na gota a colônia a ser testada, homogeneizando-se por 30 a 60 segundos até obter uma suspensão turva.

A detecção da presença de *Salmonella* antígenos “O” e “Vi” foi realizada adicionando-se uma gota do soro “O” e “Vi” e uma porção da colônia sobre uma lâmina de vidro, com o auxílio de alça descartável, formando uma suspensão homogênea e turva. A suspensão foi homogeneizada por 30 a 60 segundos e a reação positiva foi verificada através da presença de aglutinação somente na suspensão cultivo/antissoro. O mesmo procedimento foi realizado para a detecção da presença de *Salmonella* antígeno H, contudo o soro adicionado foi o “H”.

Os resultados foram positivos para *Salmonella* spp. quando as culturas apresentaram reações típicas nas provas bioquímicas e reação sorológica positiva frente aos soros “O”, “Vi” e “H”, sendo que as cepas das amostras positivas foram estriadas, com o auxílio de alça descartável, em tubos contendo ágar nutriente. Os tubos foram armazenados em temperatura de refrigeração ( $0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até o momento do envio para identificação.

## 4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS POR PCR

As cepas de *Salmonella* isoladas do frigorífico tiveram sua identidade confirmada por PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) no Câmpus Londrina da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, de acordo com trabalho descrito por Paião et al., 2013. As amostras de DNA das cepas isoladas foram extraídas através do kit comercial Wizard® Genome DNA purification (Promega). A reação em cadeia polimerase (PCR) foi realizada com 2 µL de 10x Tampão, 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,8 µL de dNTP (2,5 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (1 U/ µL), 2 µL do DNA extraído, 0,5 µL (µmol/L) de cada primer 9 Inv-A, específico para o gênero *Salmonella* e 13,4 µL de água ultra pura, totalizando volume final de 20 µL em microtubo de 0,2 mL.

O programa de amplificação do fragmento do DNA consistiu em desnaturação inicial (95 °C por 5 min), seguido de 30 ciclos de desnaturação (95 °C por 1 min), anelamento (58 °C por 1 min) e extensão (72 °C por 30 s). Ao final da reação foi incluído extensão final de 72 °C por 7 min.

Os primers utilizados na reação em cadeia polimerase estão descritos no Quadro 01.

Primers	Sequência 5'→3'	Produto (bp)	Fonte
InvA foward	CGGTGGTTTTAAGCGTACTCTT	796	Fratamico (2003)
InvA reverse	CGAATATGCTCCACAAGGTTA		

**Quadro 01. Primers utilizados na reação em cadeia da polimerase**

Após a reação de PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Para tal, o gel de agarose foi preparado a 1,2% em solução TBE (Tris Borato EDTA), acrescido de Syber Safe. Para aplicação, 7 µL da amostra foi previamente corada com 3 µL de azul de bromofenol e aplicada no poço. O gel foi submetido a 70 volts a 200 mA por 1 hora e 20 minutos. Como referência, adicionou-se 10 µL de DNA Ladder 100 pb (Promega).

### 4.3 COMPOSTOS CLORADOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS TESTADOS

Os compostos clorados testados estão apresentados na Tabela 01 e consistiram de produtos comerciais de dióxido de cloro (10 %,  $\text{ClO}_2$  comercial), dicloro isocianurato de sódio (60 %,  $\text{C}_3\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_3\text{Na}$  comercial) e ácido tricloro isocianúrico (90 %,  $\text{C}_3\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_3$  comercial). Os ácidos orgânicos testados estão apresentados na Tabela 02 e consistiram de ácido láctico p.a. (85 %,  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$ , p.a, Synth®), ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , anidro, Neon®) e ácido peracético comercial (15 %,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$  comercial).

As concentrações testadas basearam-se nas recomendações dos fornecedores de cada composto, sendo que, além destas, decidiu-se testar concentrações superiores e inferiores às recomendadas objetivando avaliar a eficiência dos compostos em várias concentrações. Assim, os compostos clorados tiveram diferentes indicações, sendo dióxido de cloro 100 ppm (mg/L), dicloro isocianurato de sódio 60 ppm (mg/L) e ácido tricloro isocianúrico 30 ppm (mg/L). Ainda, na etapa de contaminação da carne de frango foi utilizado o composto hipoclorito de sódio nas concentrações referenciadas pela legislação nacional (5,0 ppm) e legislação da União Aduaneira (0,5 ppm de cloro).

Tabela 01 – Compostos Clorados e Concentrações Testadas.

Composto	Concentração do Composto (mg/L)	Concentração de Cloro (mg/L)
	0	0
	2,5	47,56
Dióxido de Cloro (ClO <sub>2</sub> , comercial) MM: 67,45 g/mol	10	190,25
	15	285,38
	25	475,63
	50	951,26
	75	1426,89
	100	1902,52
	200	3805,04
	0	0
	2,5	12,83
Dicloro Isocianurato de Sódio (C <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Na, comercial) MM: 219,95 g/mol	5	25,83
	10	51,66
	20	103,33
	40	206,66
	50	258,5
	60	310,16
	0	0
	2,5	6
Ácido Tricloro Isocianúrico (C <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> , comercial) MM: 232,41 g/mol	5	12,11
	10	24,22
	15	36,44
	20	48,55
	25	60,66
	30	72,77
Hipoclorito de Sódio (NaCl, comercial) MM: 74,44 g/mol	0,5	8,75
	5,0	87,49

MM: Massa molar

As recomendações dos fornecedores para os ácidos orgânicos foram na faixa de 15 a 20 g/L. Da mesma forma que para os compostos clorados, decidiu-se testar concentrações superiores e inferiores às recomendadas objetivando avaliar a eficiência dos ácidos em várias concentrações. Logo, testaram-se concentrações de



1 a 30 g/L para os ácidos láctico e peracético e 2,5 a 30 g/L para o ácido cítrico (Tabela 02).

Tabela 02 – Ácidos Orgânicos e Concentrações Testadas.

Composto	Concentração (g/L)	Concentração Testada (mM)
	0	0
Ácido Láctico $C_3H_6O_3$ MM: 90,08 g/mol Ka: $1,41 \times 10^{-4}$ pKa: 3,85	1	9,99
	2	19,98
	5	49,95
	10	99,91
	15	149,87
	20	199,82
	25	249,78
	30	299,73
	0	0
Ácido Peracético $C_2H_4O_3$ , comercial MM: 76,0514 g/mol Ka: $6,30 \times 10^{-9}$ pKa: 8,2 d= 1,1g/mL	1	13,017
	2	26,03
	5	65,09
	10	130,17
	15	195,26
	20	260,35
	25	325,44
	30	390,52
	2,5	11,71
Ácido Cítrico Anidro $C_6H_8O_7$ MM: 192,124 g/mol Ka: $7,07 \times 10^{-4}$ pKa: 3,15	5	23,42
	10	46,84
	15	70,27
	20	93,69
	25	117,11
	30	140,53

MM: Massa molar

Ka: constante de dissociação

pKa: logaritmo negativo da constante de dissociação

#### 4.4 MICRO-ORGANISMOS TESTADOS

Para os testes com os compostos antimicrobianos foram utilizadas cepas padrões de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (ATCC 8326).

Os sorovares de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium foram motivados pelas demandas dos mercados importadores, notadamente União Europeia e África do Sul, sendo reconhecidos como causadores de doenças de saúde pública (CE, 2005; BRASIL, 2008). Já *Salmonella* Heidelberg foi motivada pelos históricos do frigorífico objeto do estudo, os quais revelaram que de 2014 a 2016, 82% das cepas isoladas foram identificadas como *Salmonella* Heidelberg.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS CLORADOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os testes de microdiluição em caldo (adaptado de NCCLS, 2003) foram realizados com as cepas padrões de *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e *S. Heidelberg* (ATCC 8326) testando-se os compostos clorados e ácidos orgânicos e suas respectivas concentrações discriminadas no item 4.3.

Para tanto, cada composto testado foi diluído em água destilada com um volume final de 9 mL em cada tubo. Adicionou-se, assepticamente, 1,0 mL de leite UHT integral em cada tubo, o qual objetivou simular a presença de matéria orgânica. O controle negativo consistiu de 10 mL de água destilada estéril.

Em seguida, acrescentou-se 100 µL das culturas em teste (resultando em uma concentração final de  $10^6$  UFC/mL) em cada solução testada. O tempo de contato (produto + bactéria) foi de 10, 15 e 20 minutos. Transferiu-se, então, 10 µL de cada tubo para tubos contendo 5 mL de caldo BHI e incubados a 37 °C por 72 horas.

Os resultados foram determinados através da turvação do caldo BHI, sendo considerada uma CIM o tubo com menor concentração que não apresentou turbidez, e não foi considerada uma CIM o tubo que apresentou turbidez.

Os tubos que não apresentaram turvação foram semeados em placas com ágar Salmonella-Shigella (SS) e incubadas a  $36 \pm 1$  °C por 24 horas para confirmação da ausência de crescimento bacteriano.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DO pH DAS SOLUÇÕES TESTES

O pH das soluções testes foi mensurado conforme o manual de instruções do pHmetro Bell Lab (modelo: DLA - PH).

Para a medida do pH preparou-se 10 mL de cada concentração teste dos ácidos orgânicos e dos compostos clorados, solução aquosa sem adição de leite e com a adição de leite (1 mL leite UHT integral + 9 mL da solução teste). Todas as medições foram repetidas três vezes.

Ainda, a partir da constante de dissociação e da molaridade de cada ácido orgânico, realizou-se o cálculo do pH teórico de todas as concentrações das soluções testadas com o objetivo de verificar a interferência da adição de leite nas soluções, assim como a comparação com os valores de pH experimentais, notadamente para os ácidos orgânicos obtidos comercialmente.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS SOBRE CEPAS ISOLADAS DO FRIGORÍFICO

Os testes de microdiluição em caldo foram realizados com as cepas de *Salmonella* spp. isoladas do frigorífico. Para tanto, foram utilizadas as 95 cepas isoladas e identificadas como *Salmonella* spp., previamente ativadas em caldo BHI e submetidas aos testes de CIM com os compostos ácido láctico e ácido peracético nas

concentrações de 20 g/L e 10 g/L, respectivamente. Os procedimentos seguiram as etapas discriminadas no item 4.5.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS EM ÁGUA DE *CHILLER* ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA

A partir dos resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima dos compostos testados, foram selecionados o ácido láctico e o dicloro isocianurato de sódio para a realização dos testes com a água de *chiller* (tanque de resfriamento de carcaças por imersão) artificialmente contaminada.

A água de *chiller* utilizada foi obtida do frigorífico em estudo cujo o sistema de resfriamento possui cloração de 0,3 a 0,5 ppm (mg/L).

Um total de 02 litros de água foi coletado do último estágio do sistema de resfriamento em virtude deste estágio conter a menor quantidade de matéria orgânica e reter as carcaças por um tempo mais prolongado em relação aos demais estágios (cerca de 40 minutos). A água foi coletada em frascos estéreis sob condições assépticas. Imediatamente após a coleta, os frascos de água foram transportados em recipiente isotérmico para o laboratório de Microbiologia de Alimentos da empresa responsável pelas análises. O laboratório é acreditado pela norma ABNT NBR ISO/IEC 17025.

A amostra de água foi dividida em nove alíquotas de 100 mL cada, sendo que estas foram agrupadas em 03 alíquotas, conforme ilustrado na Tabela 03. Nas alíquotas 01 e 02 foram adicionados os compostos dicloro e ácido láctico, respectivamente. Já a alíquota 03 consistiu apenas da água de *chiller* (controle positivo).

Tabela 03 – Distribuição das Alíquotas de Água de *Chiller*.

Alíquota	Cultura de <i>Salmonella</i> spp. ( $10^9$ UFC/mL)
Alíquota 01 (Dicloro Isocianurato de Sódio, 60 mg/L)	S. Typhimurium S. Enteritidis S. Heidelberg
Alíquota 02 (Ácido láctico, 20g/L)	S. Typhimurium S. Enteritidis S. Heidelberg
Alíquota 03 (água de <i>chiller</i> , controle positivo)	S. Typhimurium S. Enteritidis S. Heidelberg

Um total de 9 tratamentos foram preparados da seguinte forma: o primeiro grupo foi inicialmente contaminado artificialmente com cepas padrões de *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e *S. Heidelberg* (ATCC 8326) nas concentrações de  $10^9$  UFC/mL, sendo que em cada alíquota foi adicionado 0,1 mL da cultura de *Salmonella*, e posteriormente adicionou-se 100 mL do composto dicloro isocianurato de sódio (60 mg/L). O segundo grupo foi inicialmente contaminado artificialmente com cepas padrões de *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e *S. Heidelberg* (ATCC 8326) nas concentrações de  $10^9$  UFC/mL, sendo que em cada alíquota foi adicionado 0,1 mL da cultura de *Salmonella*, e posteriormente adicionou-se 100 mL do composto ácido láctico (20 g/L).

As alíquotas de água foram homogeneizadas e manteve-se o contato da água com o composto e a cepa padrão durante 40 minutos em temperatura de 4 °C, simulando as condições reais da etapa de resfriamento do frigorífico.

As três alíquotas de água restantes foram utilizadas para as amostras controle positivas, sendo que cada alíquota foi contaminada artificialmente com 0,1 mL das cepas padrões de *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e *S. Heidelberg* (ATCC 8326) nas concentrações de  $10^9$  UFC/mL, contudo sem a adição dos compostos.

Transcorrido o tempo de 40 minutos, procedeu-se com a técnica para contagem de *Salmonella* spp. Para tanto, a partir das alíquotas de água (diluição  $10^0$ ) foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-5}$ . Posteriormente foram inoculadas alíquotas de 0,1 mL de cada diluição no centro das placas contendo ágar verde brilhante, vermelho de fenol, lactose, sacarose (BPLS). As placas foram então

incubadas à  $36 \pm 1$  °C por 48h. Posteriormente procedeu-se com a contagem das colônias, as quais foram caracterizadas pela coloração rosa/vermelho claro, opacas, rodeadas por zonas vermelhas brilhantes. Os resultados foram expressos em UFC/g. Os ensaios foram realizados em triplicata.

A metodologia utilizada para contagem de *Salmonella* foi adaptada de Silva et al. (2010).

#### 4.9 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) SOBRE A REDUÇÃO DE *Salmonella* spp., MESÓFILOS TOTAIS E ENTEROBACTÉRIAS EM CARNE DE FRANGO

Os compostos testados na carne de frango artificialmente contaminada foram os mesmos compostos testados na água de *chiller* artificialmente contaminada, ou seja, dicloro isocianurato de sódio e ácido láctico. Adicionalmente, testou-se o composto hipoclorito de sódio nas concentrações de 5,0 ppm (mg/L) e 0,5 ppm (mg/L), sendo este de uso autorizado nos frigoríficos brasileiros e utilizado para clorar as águas industriais. A concentração de 5,0 ppm é a máxima permitida pela legislação nacional (BRASIL, 1998). Já a concentração de 0,5 ppm é a máxima permitida pela legislação da União Aduaneira (importador do frigorífico alvo do estudo) (BRASIL, 2010). Além disso, foi utilizada água esterilizada como controle positivo.

Amostras de coxa e sobrecoxa (05 coxas e sobrecoxas com peso médio de 715 gramas cada), as quais constituem a porção do frango com pH mais elevado e com maior teor de gordura, foram coletadas em condições assépticas aleatoriamente de um mesmo lote e do mesmo frigorífico do qual foram coletadas as amostras de água de *chiller*. Considerando um lote como aves que são criadas em uma mesma granja, sob as mesmas condições de manejo, alimentação, transporte, sendo abatidas no mesmo dia e de forma ininterrupta após o início.

Imediatamente após a coleta, os cortes foram acondicionados em embalagens estéreis e transportados em recipiente isotérmico para o laboratório de Microbiologia de Alimentos da empresa terceira responsável pelas análises.

Cada amostra de coxa e sobrecoxa foi imersa em uma solução contendo 100 mL de solução salina peptonada 0,1% e mais 0,1 mL da cultura de *S. Heidelberg* ATCC 8326 ( $10^9$  UFC/mL) por 30 minutos.

Transcorrido este período, cada amostra foi retirada da solução de *Salmonella* e foi disposta em saco estéril, sendo adicionados 200 mL do composto, de acordo as concentrações referenciadas na Tabela 04.

Tabela 04 – Tratamento das Coxas e Sobrecoxas Artificialmente Contaminadas.

Número da Coxa e Sobrecoxa	Solução	Concentração
CS 01	Dicloro isocianurato de sódio	60 ppm (mg/L)
CS 02	Ácido láctico	20 g/L
CS 03	Hipoclorito de Sódio	5 ppm (mg/L)
CS 04	Hipoclorito de Sódio	0,5 ppm (mg/L)
CS 05	Água esterilizada (controle positivo)	0,0

Cada solução contendo a amostra de coxa e sobrecoxa foi submetida à refrigeração (4 °C) durante 40 minutos, simulando as condições do último estágio do sistema de resfriamento do processo de abate de aves.

Após transcorrido o tempo de 40 minutos, as amostras foram retiradas das soluções e acondicionadas em embalagens estéreis, sendo adicionados 20 mL de solução salina peptonada 0,1% (diluição  $10^0$ ) para, então, dar início aos procedimentos de contagem de *Salmonella* spp., mesófilos totais e enterobactérias.

#### 4.9.1 Contagem de *Salmonella* spp.

A contagem de *Salmonella* spp. foi realizada por plaqueamento direto. Para tanto, a partir da diluição  $10^0$  foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-5}$ . Posteriormente, foram inoculadas alíquotas de 0,1 mL de cada diluição no centro das placas contendo ágar verde brilhante, vermelho de fenol, lactose, sacarose (BPLS). As placas foram, então, incubadas à  $36 \pm 1$  °C por 48 horas. Posteriormente procedeu-se com a contagem das colônias, as quais foram caracterizadas pela coloração rosa/vermelho claro, opacas, rodeadas por zonas vermelhas brilhantes.

Os resultados foram expressos em UFC/g. As análises foram realizadas em triplicata. A metodologia utilizada para contagem de *Salmonella* foi adaptada de Silva et al. (2010).

#### 4.9.2 Contagem Total de Mesófilos (Método Petrifilm™ – 3M™)

A placa Petrifilm para contagem de aeróbios (AC) é um sistema pronto de meio de cultura que contém nutrientes do ágar padrão (PCA), um composto geleificante solúvel em água fria e um indicador tetrazólio que facilita a enumeração das colônias. A técnica segue a referência do Ofício Circular nº 02 Micro/CGAL/2010, de 26/04/2010 – Métodos Alternativos Aprovados (BRASIL, 2010), e também as instruções de uso das placas para contagem de aeróbios – 3M™ - Petrifilm™. A partir da diluição 10<sup>0</sup> foram realizadas diluições seriadas até 10<sup>-5</sup>. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram semeadas no centro das placas, as quais foram incubadas à 36 ± 1 °C por 48 ± 3 horas. Após a incubação, todas as colônias vermelhas que cresceram nas placas foram contadas e os resultados foram expressos em UFC/g. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.9.3 Contagem de Enterobactérias (Método Petrifilm™ – 3M™)

A placa Petrifilm para contagem de *Enterobacteriaceae* (EB) é um sistema pronto de meio de cultura que contém nutrientes modificados de vermelho violeta bile glicose (VRBG), um composto geleificante solúvel em água fria e um indicador tetrazólio que facilita a enumeração das colônias bacterianas. A técnica segue a referência das Instruções de uso das placas para contagem de *Enterobacteriaceae* – 3M™ - Petrifilm™. A partir da diluição 10<sup>0</sup> foram realizadas diluições seriadas até 10<sup>-5</sup>. Alíquotas de 1 mL de cada diluição foram semeadas no centro das placas, as quais foram incubadas à 36 ± 1 °C por 24 ± 2 horas. Após a incubação, todas as colônias típicas (vermelhas com zonas amarelas e/ou colônias vermelhas com bolhas de gás, com ou sem zonas amarelas) que cresceram nas placas foram



contadas e os resultados foram expressos em UFC/g. As análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.9.4 Tratamento Estatístico dos Dados

Os resultados para os compostos testados na carne de frango artificialmente contaminada foram convertidos em  $\log_{10}$  e submetidos ao tratamento estatístico pela análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey com 5 % de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando o software STATISTICA versão 12.0 (Statsoft Inc., USA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp. DE CARÇAÇAS DE FRANGO

Um total de 102 cepas de *Salmonella* spp. foram isoladas a partir de carcaças de frango provenientes do frigorífico objeto do estudo, sendo que os isolamentos e respectivos meses estão demonstrados na Tabela 05.

Tabela 05 – Isolamento das Cepas de *Salmonella* spp. de Carcaças de Frango.

Número da Cepa	Mês Isolamento	Número de Isolados
1 – 24 e 33	Junho/2014	25
25 - 61	Julho/2014	38
62 - 95	Agosto/2014	33
96 - 102	Setembro/2014	6
TOTAL		102

Os resultados obtidos reforçam a necessidade de práticas de intervenção para reduzir a ocorrência do patógeno, principalmente no que se refere aos controles à nível de campo (aviários, intervalo maior entre um alojamento e outro, intervenções medicamentosas via água ou via ração, entre outras), pois o lote de aves estando contaminado com o micro-organismo em questão irá carrear a contaminação para as instalações frigoríficas e contaminando, inclusive, outros lotes de aves que forem abatidos em seguida.

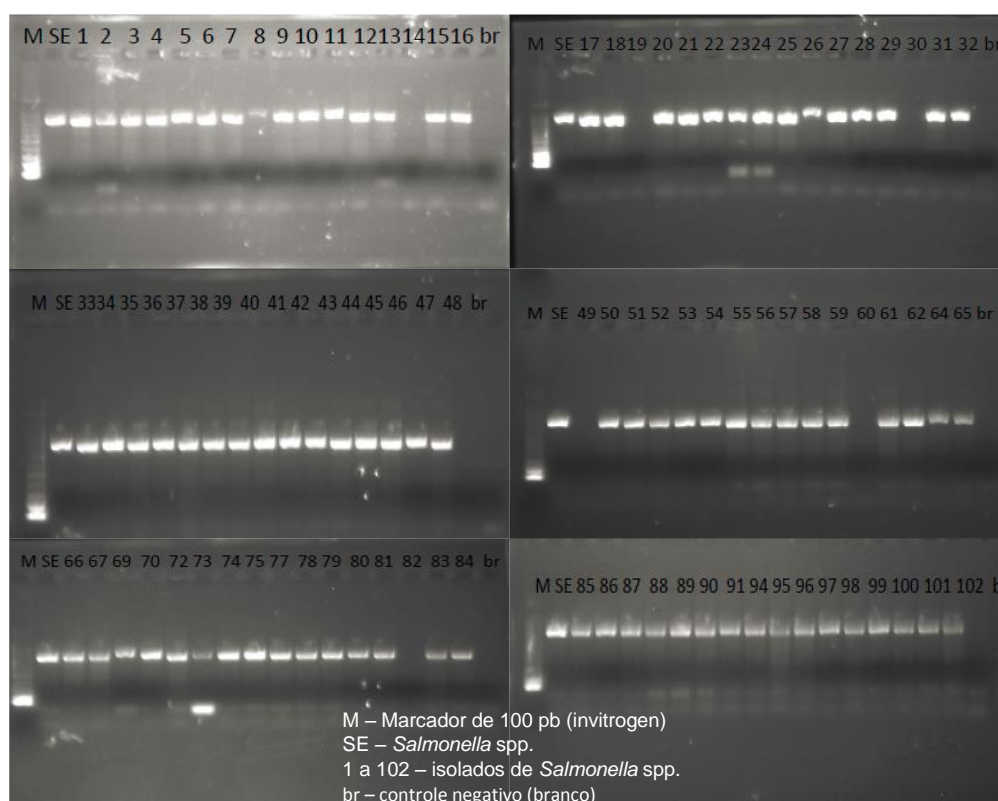
Complementar aos resultados, salienta-se que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa nº 70 (2003), admite que a carne de aves brasileira não é ausente de *Salmonella* spp., ou seja, a cada ciclo de 51 amostras oficiais coletas, permite-se que 12 amostras sejam positivas (BRASIL, 2003). Logo, tal legislação admite um percentual de 23,53% de positividade de *Salmonella* spp. dentro dos frigoríficos brasileiros.

Colla et al. (2012) isolou cepas de *S. Heidelberg* de frangos logo após a depenagem e na água do *chiller* indicando que, embora não tenha sido realizado o isolamento em outros pontos amostrados, a bactéria estava presente no ambiente e poderia contaminar carcaças prontas para consumo, com reflexos na saúde pública.

Ainda, enfatizou que o isolamento de *S. Heidelberg* reforça esta preocupação, uma vez que este sorovar tem se destacado como causador de doenças transmitidas por alimentos.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS CEPAS ISOLADAS

Dentre as 102 cepas isoladas, 95 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Salmonella* spp., representando 93,1% do total das cepas. Contudo, evidenciou-se que 07 cepas (6,9%), não apresentaram amplificação para o gene *InvA*, conforme mostra a Figura 11.



**Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% mostrando os produtos de amplificação para o gene *InvA*.**

O gene *invA* está localizado na ilha de patogenicidade SP-1 e é o que confere à bactéria o fenótipo de invasão, ou seja, o gene faz-se necessário para que a bactéria tenha a capacidade de invadir e causar infecção em seu hospedeiro.

Castilla (2003), analisou a presença dos genes *spvC*, *sefC*, *pefA* e *invA* em 120 cepas de *Salmonella* Enteritidis por meio da técnica de PCR. As cepas

pesquisadas apresentaram amplificação para os genes *spvC* em 94%, *sefC* em 97,5%, *pefA* em 97% e *invA* em 100%.

Na Tabela 06 estão apresentadas as cepas isoladas que foram positivas para o gênero *Salmonella*, bem como as cepas que apresentaram reação negativa. Neste sentido, enfatiza-se a necessidade de utilizar outros primers para identificação do gênero *Salmonella*, pois as cepas em questão não apresentaram amplificação para o gene *InvA*, mas podem apresentar amplificação para outros genes que as identifiquem como pertencentes ao gênero em questão.

Tabela 06 – Identificação das Cepas de *Salmonella* spp. Isoladas por PCR.

Número da Cepa	Identificação
1 – 13; 15 – 18; 20 – 29; 31 – 48; 50 – 59; 61 – 81; 83 - 101	<i>Salmonella</i> spp.
14; 19; 30; 49; 60; 82; 102	Reação Negativa

Freitas (2008), ao realizar a verificação da presença de *Salmonella* spp. e dos sorotipos Enteritidis, Typhi e Typhimurium em carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal, tanto pela técnica de PCR múltipla (m-PCR) quanto pela análise microbiológica tradicional, observou que a m-PCR foi capaz de realizar a detecção de *Salmonella* spp. em 2,74% das amostras de miúdos. A identificação do sorotipo Enteritidis ocorreu em 1,37% dos miúdos. Em relação às carcaças, não foi detectada nenhuma amostra positiva para *Salmonella* spp. pelos dois métodos de diagnósticos. Logo, a m-PCR, além de fornecer o diagnóstico em 18h, foi capaz de identificar o sorotipo Enteritidis.

Mir et al. (2015), ao estudar a ocorrência e a diversidade de sorotipos de *Salmonella* (por PCR) isolados de diferentes espécies de aves (frango, emu e pato), constatou que das 507 amostras processadas, foram encontrados 32 isolados de *Salmonella* entérica (18 de conteúdo cecal e 14 de amostras de fezes), dos quais 24 pertenciam a 6 diferentes sorovares diferentes, sendo que *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo mais predominante, seguido pela *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Reading e *Salmonella* Atona.

Para o referido estudo, a identificação de sorotipos de *S. Heidelberg* está em andamento e será realizada por sequenciamento de uma região do gene *gyr* que codifica girase, enzima envolvida na replicação de DNA, e na resistência de

quinolonas. O sequenciamento das amostras isoladas será comparado com a mesma sequência de *Salmonella* de diferentes sorovares depositadas no gene bank.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS CLORADOS E ÁCIDOS ORGÂNICOS

#### 5.3.1 Compostos Clorados

As Tabelas 07 e 08 apresentam os resultados para a atividade antimicrobiana do dióxido de cloro e os valores de pH das soluções testadas, respectivamente.

Tabela 07 – Atividade Antimicrobiana do Dióxido de Cloro na Inibição do Crescimento de *Salmonella* spp.

Cepas	Tempo (min)	Dióxido de Cloro [mg/L]								
		0	2,5	10	15	25	50	75	100	200
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	10	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg (ATCC 8326)	10	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)	10	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R: Resistente

S: Sensível

Tabela 08 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Dióxido de Cloro com Leite e sem Leite.

Concentração (mg/L)	pH (solução 1:10 de leite)	pH (solução aquosa)
0,0	7,09	8,85
5,0	7,18	8,10
10	7,33	8,04
25	7,56	8,49
50	8,12	9,53
75	8,79	9,74
100	9,30	9,74
200	9,84	9,93

A partir da análise dos dados da Tabela 07, observou-se que não houve inibição do crescimento bacteriano em nenhuma das concentrações e tempos de exposição testados. Logo, a atividade antimicrobiana do produto comercial de dióxido de cloro não foi satisfatória na inibição de *Salmonella* spp.

Dentre os fatores que podem estar associados à baixa eficiência do dióxido de cloro, menciona-se a formulação do produto, sendo que o composto utilizado nos experimentos foi obtido comercialmente e as concentrações das soluções foram preparadas a partir do teor de cloro especificado pelo fornecedor. Enfatiza-se também que a apresentação do produto é na forma líquida envasado em recipiente de material plástico transparente. Logo, o teor de cloro presente no produto pode ter sofrido alterações em decorrência principalmente da luz e do calor, influenciando na estabilidade do produto.

Ainda, a partir dos dados da Tabela 08, observou-se que os valores de pH experimentais variaram de 9,84 a 7,18, nas concentrações de 200 a 5 ppm (mg/L), respectivamente. Neste sentido, os compostos clorados são mais efetivos em valores de pH baixos quando a presença de ácido hipocloroso, o qual possui efeito bactericida, é dominante. Tal fato pode explicar a baixa eficiência do composto testado (MACEDO, 2004).

Ainda segundo Macedo (2004), a ação oxidante e sanificante dos derivados clorados é controlada pelo ácido hipocloroso (HClO), o qual é um produto resultante da hidrólise da substância clorada. O ácido hipocloroso é um ácido fraco, cujos valores de  $K_a$  e  $pK_a$  são, respectivamente,  $3,18 \times 10^{-8}$  e 7,497 e em solução aquosa

se dissocia para formar o íon hidrogênio e o íon hipoclorito. Desta forma, o autor referencia que em valores de pH acima de 8,5 a concentração de HClO em solução é tão pequena que não se tem uma ação sanitizante eficiente.

Em relação aos valores de pH das soluções aquosas ou adicionadas de leite (1:10), não foram observadas alterações que pudessem interferir na ação do composto testado, visto que a adição de leite acarretou em uma leve diminuição de todos os valores de pH das soluções testadas.

Diferente dos resultados deste estudo, Pao et al. (2007) referenciados por Moretro et al. (2012), avaliaram a efetividade do dióxido de cloro em diferentes concentrações (5,0, 10 e 20 mg/L) e tempos de exposição (2, 4 e 6 segundos) contra uma mistura de cepas de *S. Enteritidis*, *S. Newport* e *S. Typhimurium* em água. Estes autores observaram que as concentrações e tempos testados resultaram em reduções completas das cepas avaliadas ( $>5 \log_{10}$ ).

Nas Tabelas 09 e 10 estão apresentados os resultados obtidos para o ácido tricloro isocianúrico e os valores de pH medidos, respectivamente.

Tabela 09 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Tricloro Isocianúrico na Inibição do Crescimento de *Salmonella* spp.

Cepas	Tempo (min)	Ácido Tricloro Isocianúrico [mg/L]							
		0	2,5	5	10	15	20	25	30
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	10	R	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg (ATCC 8326)	10	R	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)	10	R	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	R	R	R

R: Resistente

S: Sensível

Tabela 10 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Ácido Tricloro Isocianúrico com Leite e sem Leite.

Concentração (mg/L)	pH (solução 1:10 de leite)	pH (solução aquosa)
0,0	6,93	8,21
2,5	6,66	4,50
5,0	6,33	3,93
10	6,30	3,56
15	6,08	3,44
20	6,00	3,26
25	5,90	3,13
30	5,57	3,01

Os dados da Tabela 09 revelam que o ácido tricloro isocianúrico não foi capaz de inibir o crescimento das cepas padrões nas concentrações testadas. A baixa eficiência do produto pode ser explicada em partes pela formulação do produto, sendo que o composto utilizado nos experimentos foi obtido comercialmente e as concentrações das soluções foram preparadas a partir do teor de cloro especificado pelo fornecedor.

Salienta-se que o ácido tricloro isocianúrico possui dissolução lenta, sendo este um dos fatores que pode ter prejudicado a eficiência do composto, visto que o tempo máximo de exposição do ácido com as cepas foi de 20 minutos. Aliado a este fato, destaca-se também que por apresentar uma estrutura química estável, o composto pode ter reagido lentamente com a matéria orgânica, representada pela adição do leite, o que levou a uma liberação mais lenta do ácido hipocloroso.

Diante do exposto, verificou-se que os tempos de exposição do composto com as cepas podem estar relacionados com a sua baixa eficiência, visto que os tempos de 10, 15 e 20 minutos foram insuficientes para que o ácido hipocloroso pudesse ser liberado, de modo a penetrar na célula bacteriana e causar a sua destruição.

Os valores de pH das soluções testadas das soluções com leite e sem leite referenciados na Tabela 10 demonstraram que a adição de leite acarretou na elevação do pH de todas as concentrações testadas, sendo que os valores de pH experimentais variaram de 5,57 a 6,66 nas concentrações de 30 a 2,5 ppm (mg/L), respectivamente. Contudo, dada a estabilidade do composto frente à matéria



orgânica, este não é um fator a ser considerado em relação à atividade antimicrobiana do ácido.

Ainda, não foi possível relacionar os resultados encontrados com pesquisas anteriores, pois a maior fonte de uso do ácido tricloro isocianúrico é no tratamento de águas, devido a sua alta estabilidade e pouca reação com a matéria orgânica (BRASIL, 2015).

Fajardo (2009) avaliou a eficácia do ácido tricloro isocianúrico como composto de desinfecção de cenouras inoculadas com *Salmonella* spp. (1, 5, 50 e 100 UFC por amostra). Os resultados foram satisfatórios quando a concentração testada foi de 200 ppm.

Murro (2012) relacionou a diminuição da eficiência dos compostos clorados com o uso frequente destes compostos, pois com o uso prolongado, os microorganismos podem desenvolver tolerância aos compostos, não sofrendo mais nenhuma alteração que afete o seu desenvolvimento. Este autor destacou ainda que a variação da atividade antimicrobiana destes compostos pode estar associada à alguns fatores importantes como os efeitos de formulação, a presença de uma carga orgânica, sinergia, temperatura, diluição e métodos de ensaio aplicados.

As Tabelas 11 e 12 apresentam os resultados obtidos para dicloro isocianurato de sódio e os valores de pH medidos, respectivamente.

Tabela 11 – Atividade Antimicrobiana do Dicloro Isocianurato de Sódio na Inibição do Crescimento de *Salmonella* spp.

Cepas	Tempo (min)	Dicloro Isocianurato de Sódio [mg/L]							
		0	2,5	5	10	20	40	50	60
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	10	R	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg (ATCC 8326)	10	R	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R	S
	20	R	R	R	R	R	R	R	S
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)	10	R	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	R	R	S

R: Resistente

S: Sensível

Tabela 12 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Dicloro Isocianurato de Sódio com Leite e sem Leite.

Concentração (mg/L)	pH (solução 1:10 de leite)	pH (solução aquosa)
0,0	6,87	7,36
2,5	6,95	8,19
5,0	6,97	8,38
10	6,98	8,40
20	6,95	8,18
40	6,79	7,64
50	6,58	7,15
60	6,39	7,06

Os dados da Tabela 11 demonstram que a solução de dicloro isocianurato de sódio apresentou inibição de crescimento de duas sorovares de *Salmonella*, sendo *Salmonella* Heidelberg na concentração de 60 ppm (mg/L) durante os tempos de exposição de 15 e 20 minutos e *Salmonella* Enteritidis na concentração de 60 ppm (mg/L) durante o tempo de exposição de 20 minutos.

Logo, percebeu-se que a atividade antimicrobiana do composto clorado dicloro isocianurato de sódio é capaz de inibir o crescimento de *Salmonella*, com exceção da *Salmonella* Typhimurium, a qual revelou resistência ao composto testado em todas as concentrações e tempos avaliados.

É importante destacar que o dicloro isocianurato de sódio utilizado nos experimentos foi obtido comercialmente e as concentrações das soluções foram preparadas a partir do teor de cloro especificado pelo fornecedor. Ainda, o dicloro isocianurato de sódio em solução aquosa libera ácido hipocloroso e isocianurato de sódio. Seu espectro de ação assemelha-se ao ácido tricloro isocianúrico, visto que o composto apresenta uma estrutura química estável e reage lentamente com a matéria orgânica, representada pela adição do leite, o que leva a uma liberação mais lenta do ácido hipocloroso (MACEDO, 2004; BRASIL, 2015). Vale destacar que foi necessária uma concentração elevada do composto (60 ppm) e um tempo de exposição de 15 e 20 minutos para inibir o crescimento de *S. Heidelberg* e *S. Enteritidis*, respectivamente.

Ferreira e Queiroz (2013) realizaram um estudo com ovos para avaliar a eficiência do composto antimicrobiano dicloro isocianurato de sódio na inibição de

*Salmonella* Enteritidis, onde utilizaram as concentrações de 5 ppm, 30 ppm e 50 ppm, obtendo resultados de inibição em todas as concentrações.

Em relação ao pH, de acordo com os dados da Tabela 12, observou-se que o pH das soluções testadas com leite sofreu uma pequena diminuição em relação ao pH das soluções sem leite, sendo que os valores de pH experimentais variaram de 6,39 a 6,95 nas concentrações de 60 a 2,5 ppm (mg/L), respectivamente. Contudo, dada a estabilidade do composto frente à matéria orgânica, este não é um fator a ser considerado em relação à atividade antimicrobiana do ácido.

### 5.3.2 Ácidos Orgânicos

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados da atividade antimicrobiana obtidos para o Ácido Lático e na Tabela 14 os valores médios de pH das soluções testadas com leite, sem leite, assim como os valores teóricos calculados para as soluções nas concentrações testadas.

Tabela 13 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Lático na Inibição do Crescimento de *Salmonella* spp.

Cepas	Tempo (min)	Ácido Lático [g/L]						
		0	1	2	5	10	15	20
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	10	R	R	R	R	R	R	S
	15	R	R	R	R	S	S	S
	20	R	R	R	R	S	S	S
<i>Salmonella</i> Heidelberg (ATCC 8326)	10	R	R	R	R	R	R	S
	15	R	R	R	R	R	R	S
	20	R	R	R	R	S	R	S
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)	10	R	R	R	S	S	S	S
	15	R	R	R	S	S	S	S
	20	R	R	R	S	S	S	S

R: Resistente

S: Sensível

Tabela 14 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Ácido Lático com Leite e sem Leite e pH Teórico.

Concentração (g/L)	pH (solução 1:10 de leite)	pH (solução aquosa)	pH Teórico
1,00	3,51	2,83	2,92
2,00	3,39	2,80	2,77
5,00	2,91	2,62	2,58
10,00	2,57	2,31	2,42
15,00	2,50	2,27	2,34
20,00	2,33	2,14	2,27
25,00	2,27	2,15	2,22
30,00	2,21	2,09	2,18

A partir dos dados da Tabela 13 observa-se que *S. Typhimurium* foi inibida nas concentrações de 10, 15 e 20 g/L nos tempos de 15 e 20 minutos de exposição, sendo considerada a concentração inibitória mínima 10 g/L por 15 minutos. A cepa de *S. Heidelberg* teve o crescimento inibido na concentração de 20 g/L nos tempos de 10, 15 e 20 minutos, sendo esta a concentração inibitória mínima. Já para a cepa de *S. Enteritidis* observou-se que nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 g/L houve inibição do crescimento nos tempos de exposição de 10, 15 e 20 minutos, resultando na concentração inibitória mínima de 5 g/L durante um tempo de exposição de 10 minutos. Logo, frente ao ácido lático, observou-se que a *Salmonella Heidelberg* apresentou maior resistência diante das concentrações e tempos avaliados quando comparada com a *Salmonella Enteritidis*, a qual revelou-se mais sensível ao composto testado.

Em relação ao pH, de acordo com os dados da Tabela 14, constatou-se que para o ácido lático, as soluções testes nas concentrações inibitórias mínimas apresentaram valores de pH de 2,91 (5 g/L), 2,57 (10 g/L) e 2,33 (20 g/L), revelando-se inferiores ao pKa do ácido (3,85). Enfatiza-se que o efeito bactericida dos ácidos orgânicos é ocasionado pela forma não dissociada, sendo esta mais concentrada em valores de pH abaixo do pKa. Embora a partir da concentração de 1 g/L o valor de pH registrado foi de 3,51, observou que pH superiores a 2,91 não foram capazes de inibir nenhuma das cepas testadas, sendo que o pH com maior eficiência foi de 2,33 na concentração de 20 g/L, pois acarretou na inibição de todas as cepas.

Simões (2014) usando ácidos orgânicos em aves de corte, entre eles o ácido láctico, observou que houve redução de aves contaminadas por *Salmonella* Heidelberg e mais significativamente teve ação contra *Salmonella* Enteritidis, o que confirma o efeito do ácido do láctico que difere na concentração aplicada e o tipo de sorovar inibido.

Kang et al. (2003) estudaram os efeitos de pulverizações de ácidos orgânicos (láctico, cítrico e acético) em várias concentrações (0,5, 1, 1,5 e 2%) sobre lombos suínos em relação às características microbiológicas e redução de *Salmonella* Typhimurium. As pulverizações de ácido láctico ocasionaram reduções de 0,4 a 1,4 log UFC/cm<sup>2</sup> de *S. Typhimurium*, enquanto que o ácido cítrico reduziu de 0,6 a 1,5 log UFC/cm<sup>2</sup> e o ácido acético reduziu de 0,5 a 1,5 log UFC/cm<sup>2</sup>. A atividade bactericida foi maior na concentração de 2% para todos os ácidos. Os autores mencionam ainda que o efeito bactericida dos ácidos orgânicos não foi devido apenas pela diminuição do pH, mas também pela concentração dos ácidos.

Burin, Silva Jr. e Nero (2012) avaliaram o comportamento de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de pontos do processamento de carne bovina e suína, sobre as condições de estresse ácido criado pelo ácido láctico e ácido acético, a fim de avaliar as variações nas suas populações microbianas e a expressão de genes envolvidos na tolerância ácida. Como resultados, estes autores observaram a capacidade de adaptação de *Salmonella* spp. quando em contato com soluções de ácido láctico e de ácido acético, em valores de pH entre 5,0 e 6,0, com clara expressão do gene *rpoS*. Contudo, os autores sugerem a necessidade de mais estudos para investigar o comportamento da tolerância ao ácido em sistemas cárneos, a fim de prever os possíveis efeitos do ácido orgânico na pulverização de carcaças de animais relacionados com o desenvolvimento de cepas de *Salmonella* resistentes.

Os resultados da atividade antimicrobiana e os valores de pH do ácido peracético estão referenciados nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Tabela 15 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Peracético na Inibição do Crescimento de *Salmonella* spp.

Cepas	Tempo (min)	Ácido Peracético [g/L]						
		0	1	2	5	10	15	20
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	10	R	R	R	R	S	S	S
	15	R	R	R	R	S	S	S
	20	R	R	R	R	S	S	S
<i>Salmonella</i> Heidelberg (ATCC 8326)	10	R	R	R	R	S	S	S
	15	R	R	R	R	S	S	S
	20	R	R	R	R	S	S	S
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)	10	R	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	R	R	R	R	R
	20	R	R	R	R	S	S	S

R: Resistente

S: Sensível

Tabela 16 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Ácido Peracético com Leite e sem Leite e pH Teórico.

Concentração (g/L)	pH (solução 1:10 de leite)	pH (solução aquosa)	pH Teórico
1,00	4,10	3,34	5,04
2,00	3,78	2,86	4,89
5,00	3,23	2,59	4,69
10,00	2,79	2,39	4,54
15,00	2,61	2,24	4,45
20,00	2,34	2,12	4,39
25,00	2,28	2,04	4,34
30,00	2,28	1,91	4,30

A partir dos dados da Tabela 15, observou-se que as menores concentrações testadas (1 a 5 g/L) não foram suficientes para acarretar a inibição das cepas de *Salmonella*. Contudo, evidenciou-se que o crescimento das cepas de *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* foi inibido nas concentrações de 10, 15 e 20 g/L no tempo de 10 minutos. Logo, para estas cepas a concentração inibitória mínima foi de 10 g/L durante o tempo de exposição de 10 minutos. Já para a cepa de *S. Enteritidis* houve inibição de crescimento nas concentrações de 10, 15 e 20 g/L, porém no tempo de 20 minutos. Desta forma, para a cepa em questão, a CIM foi de 10 g/L

com tempo de exposição de 20 minutos, evidenciando que frente ao composto testado, a cepa de *S. Enteritidis* apresenta maior resistência do que as demais.

Em relação aos valores de pH das soluções testes de ácido peracético, (Tabela 16) evidenciou-se que na CIM (10 g/L) o pH foi de 2,79. Apesar de todas as concentrações terem apresentado valores de pH ( $\text{pH} \leq 4,10$ ) abaixo do valor do pKa do ácido peracético ( $\text{pKa} = 8,20$ ), somente em valores de pH menores ou iguais a 2,79 o ácido peracético foi capaz de inibir o crescimento de *Salmonella*.

Machado et al. (2010), ao estudarem a susceptibilidade do ácido peracético em relação a *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Bredeney*, evidenciaram que na concentração de uso indicada pelo fabricante (1%) e na metade dessa concentração (0,5%), todos os micro-organismos demonstraram sensibilidade nos tempos avaliados (5, 10, 15 e 20 minutos). Ainda, verificaram que as concentrações de 0,3%, 0,2% e 0,1% indicaram maior resistência dos micro-organismos *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*.

Costa (2010) testou o ácido peracético no processo de desinfecção terminal e esterilização obtendo como resultado a eficácia do mesmo em baixas concentrações e em um curto intervalo de tempo, porém ressaltou que a estabilidade do ácido é um fator determinante na ação antimicrobiana. Apesar de não haver interferência da matéria orgânica, o pH e a temperatura interferem na decomposição do mesmo em ácido acético e oxigênio diminuindo a ação antimicrobiana.

Beltrame (2009) testou quatro princípios ativos utilizados nas indústrias de alimentos (ácido peracético, clorexidina, quaternário de amônio e uma mistura de ácidos orgânicos), frente a quatro bactérias reconhecidas no mercado como problema para a indústria cárnea, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Dentre eles, o ácido peracético teve um bom desempenho em concentrações e tempos menores que os indicados pelos fornecedores, confirmando que este composto pode ser utilizado em dosagens menores, o que torna seu uso viável nas indústrias.

Um estudo realizado pela European Food Safety Authority avaliou a segurança e a eficácia de soluções contendo ácido peracético (PAA) como ingrediente ativo, e em mistura com ácido acético, peróxido de hidrogênio e ácido 1 - hidroxietilideno – 1,1 – difosfônico (HEDP) e possibilidade de ácido octanóico e peroxi octanóico para a redução de patógenos sobre carcaças de frango e pedaços de carne. Os resultados revelaram que não foram identificadas preocupações de

toxicidade no que diz respeito aos resíduos de perácidos de HEDP e de possíveis produtos da reação de peróxido de hidrogênio e perácidos com lípidios e proteínas de carcaças de aves. Houve redução relevante de *E. coli* e coliformes nas carcaças imersas em ácido peracético, mas poucos resultados de redução foram obtidos para *Salmonella* e *Campylobacter*. Ainda, o surgimento de resistência aos antimicrobianos terapêuticos após o uso do ácido peracético foi considerado improvável (EFSA, 2014).

Scur et al. (2014), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de glutaraldeído, quaternário de amônia, hipoclorito de sódio, compostos de ácidos orgânicos, ácido peracético e iodofor em diferentes concentrações e tempo de exposição de 20 minutos frente a *S. Enteritidis*, observaram que os desinfetantes compostos de ácidos orgânicos e ácido peracético, na presença de matéria orgânica, foram os de maior eficácia no controle do *S. Enteritidis*, e que na ausência de matéria orgânica os desinfetantes a base de ácido peracético, ácidos orgânicos e hipoclorito de sódio reduziram em 100% as contagens de *S. Enteritidis* nas concentrações testadas.

As Tabelas 17 e 18 apresentam os resultados da atividade antimicrobiana do ácido cítrico e os valores de pH para as soluções testadas, respectivamente.

Tabela 17 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Cítrico na Inibição do Crescimento de *Salmonella* spp.

Cepas	Tempo (min)	Ácido Cítrico [g/L]					
		2,5	5	10	15	20	25
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	10	R	R	S	S	S	S
	15	R	R	S	S	S	S
	20	R	R	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> Heidelberg (ATCC 8326)	10	R	R	R	R	R	R
	15	R	R	S	R	R	R
	20	R	R	R	R	R	S
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)	10	R	R	S	S	S	S
	15	R	R	S	S	S	S
	20	R	R	S	S	S	S

R: Resistente

S: Sensível



Tabela 18 – Valores Médios de pH para as Diferentes Concentrações das Soluções de Ácido Cítrico com Leite e sem Leite e pH Teórico.

Concentração (g/L)	pH (solução 1:10 de leite)	pH (solução aquosa)	pH Teórico
2,50	5,85	3,63	2,54
5,00	4,80	3,40	2,39
10,00	4,63	3,16	2,24
15,00	2,41	2,21	2,15
20,00	2,38	2,13	2,09
25,00	2,26	2,08	2,04
30,00	2,22	2,03	2,00

Os dados da Tabela 17 mostram que as concentrações iguais ou menores que 5 g/L não foram suficientes para inibir o crescimento de nenhuma das cepas testadas. Com exceção da *Salmonella* Heidelberg, as demais cepas foram inibidas a partir de 10 minutos de exposição nas concentrações de 10, 15, 20 e 25 g/L. Logo, a CIM para ambas as cepas foi de 10 g/L no tempo de 10 minutos. Já para a cepa de *Salmonella* Heidelberg houve inibição do crescimento com 25 g/L no tempo de 20 minutos. Essa diferença ocorreu por uma possível resistência da *Salmonella* Heidelberg em relação ao composto testado.

No que tange aos valores de pH (Tabela 18), observou-se que para o ácido cítrico as soluções testes nas concentrações inibitórias mínimas apresentaram valores de pH de 4,63 (10 g/L) e 2,26 (25 g/L). Logo, considerando que o pKa do composto em questão é 3,15, constatou-se que os valores de pH das soluções de ácido cítrico foram influenciados pela adição do leite, em especial na concentração de 10 g/L. Porém essa influência não foi significativa em relação à inibição de *Salmonella*, pois o pH de 4,63 (pH no qual predomina a forma dissociada do ácido), demonstrou efetividade na inibição do crescimento bacteriano, notadamente *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. Já a cepa *S. Heidelberg*, a qual apresentou maior resistência frente ao ácido, demandou de 25 g/L do composto para ser inibida, sendo que nesta concentração o pH da solução foi de 2,26, ou seja, neste valor de pH predominou a forma não dissociada do ácido, a qual possui o efeito bactericida.

Apesar do ácido cítrico ser um ácido de cadeia curta e ser um bom antimicrobiano, observou-se que houve uma maior resistência da *Salmonella*

Heidelberg. Segundo Simões (2014), o uso de ácido cítrico isoladamente na dieta do frango como antimicrobiano não possui efeito significativo.

Porém a resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos depende do sorotipo, uma vez que existem diferenças significativas no perfil de resistência entre diferentes sorotipos (PANDINI et al., 2015).

Bactérias Gram-negativas podem apresentar resistência e adaptação aos ácidos. Logo, a concentração inibitória mínima é definida pela habilidade de dissociação deste ácido e da capacidade deste de atravessar a membrana plasmática das bactérias, sendo que a toxicidade é determinada para cada ácido orgânico e também para cada tipo de micro-organismo (VIOLA, 2006).

No estudo realizado por Kang et al. (2003), a pulverização de ácido cítrico nas concentrações de 0,5, 1, 1,5 e 2% sobre lombos suínos resultou na redução de *S. Typhimurium* de 0,6 a 1,5 log UFC/cm<sup>2</sup>. Logo, estes autores enfatizaram que, dentro os ácidos testados, o ácido cítrico teve o melhor efeito inibitório.

Considerando os valores de pKa dos ácidos peracético (pKa= 8,20), láctico (pKa= 3,85) e cítrico (pKa= 3,15), o ácido cítrico é considerado o ácido mais forte.

De acordo com dados referenciados na Tabela 14, os valores de pH experimental do ácido láctico foram similares aos valores de pH teórico. Contudo, a adição de leite na solução teste acarretou uma pequena elevação do pH, mas essa adição não influenciou na efetividade do ácido.

O ácido peracético é considerado o ácido mais fraco dentre os ácidos avaliados, sendo que nas concentrações testadas, os valores de pH teórico variaram de 4,30 a 5,04, enquanto que os valores de pH experimental variaram de 2,28 a 4,10, para as concentrações de 30 a 1 g/L, respectivamente, de acordo com os dados referenciados na Tabela 16. Tal fato se deve à origem do ácido peracético utilizado nos experimentos, pois sendo este um produto comercial, não foi possível atestar sua pureza. No entanto, as recomendações do fornecedor de 10 a 20 g/L com  $\text{pH} \leq 2,79$  foram eficientes na inibição de *Salmonella*. Ainda, a adição de leite na solução teste acarretou uma pequena elevação do pH, mas essa adição não teve influência na efetividade do ácido.

Os valores de pH teórico do ácido cítrico variaram de 2,0 a 2,54, enquanto que os valores de pH experimentais variaram de 2,22 a 5,85, para as concentrações de 30 a 2,5 g/L, conforme os dados apresentados na Tabela 18. A adição do leite na solução teste promoveu um pequeno aumento no pH em todas as concentrações

testadas. Contudo, observou-se que essa adição de leite não influenciou na efetividade do ácido para a inibição de *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, sendo que na concentração de 10 g/L o pH de 4,63 foi superior ao pKa do ácido (pKa= 3,15). Já para *S. Heidelberg*, a inibição ocorreu no pH de 2,26, sendo necessário o tempo de exposição de 20 minutos.

As concentrações de 25 e 30 g/L para o ácido láctico e ácido peracético, e a concentração de 30 g/L para o ácido cítrico não apresentaram inibição de crescimento das cepas testadas, sendo necessário novos experimentos para avaliar o ocorrido. Logo, em virtude dos resultados inconclusivos, estes não foram apresentados nas tabelas.

Em relação aos testes para confirmação da inibição do crescimento em placas, todos os resultados foram negativos para o crescimento das cepas em questão. Logo, teve-se a confirmação de que as concentrações mínimas inibitórias tiveram êxito contra as cepas padrões em estudo.

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS SOBRE CEPAS ISOLADAS DO FRIGORÍFICO

A Tabela 19 apresenta os resultados para a atividade antimicrobiana do ácido láctico e do ácido peracético na inibição das cepas de *Salmonella* spp. isoladas do frigorífico objeto do estudo.

Tabela 19 – Atividade Antimicrobiana do Ácido Láctico e do Ácido Peracético sobre a Inibição de *Salmonella* spp. Isoladas do Frigorífico.

Compostos	Crescimento Positivo	Inibição do Crescimento	Total de Cepas Isoladas Testadas
Ácido Láctico (20 g/L)	02 (2,11%)	93 (97,89%)	95 (100%)
Ácido Peracético (10 g/L)	00 (0,0%)	95 (100%)	95 (100%)

A partir dos resultados demonstrados na Tabela 19, observa-se que o ácido peracético foi capaz de inibir as 95 cepas isoladas. Já o ácido láctico resultou na inibição de 93 cepas (97,89%), sendo que duas cepas se mostraram resistentes ao ácido láctico (2,11%).

Os testes para a confirmação da inibição do crescimento em placas apresentaram resultados negativos para o crescimento das cepas em questão. Logo, teve-se a confirmação de que as concentrações mínimas inibitórias tiveram êxito contra as cepas isoladas.

Logo, os resultados obtidos reforçam a eficiência destes ácidos orgânicos na inibição de *Salmonella* spp., destacando a necessidade de discussões à nível nacional para regulamentar o uso de ácidos orgânicos como coadjuvantes de tecnologia no abate de aves, visto que tanto o ácido láctico quanto o ácido peracético possuem o uso permitido nos Estados Unidos como descontaminantes de carcaças de aves em concentrações de no máximo 50 g/L e 0,22 g/L, respectivamente (FSIS, 2012).

Vivian (2014) testou a capacidade bactericida do ácido peracético nas concentrações de 0,3, 0,4 e 0,5% sobre cepas de *Salmonella* spp. isoladas de esteiras de processamento de um frigorífico de aves e evidenciou que o aumento na concentração do ácido tem efeito direto sobre a sua capacidade sanitizante, sendo que na concentração de 0,5%, as 34 cepas foram sensíveis ao composto.

Nagel et al. (2013) avaliaram a eficácia de cinco compostos antimicrobianos adicionados em um tanque de imersão contra a redução de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em carcaças de aves. Os compostos testados consistiram de cloro (40 ppm), ácido peracético (400 e 1000 ppm) e lisozima (1000 e 5000 ppm). Nestas condições, o ácido peracético a 400 ppm foi mais efetivo e reduziu significativamente as populações de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. quando comparado aos tratamentos com cloro e lisozima. Logo, os autores sugerem que o ácido peracético é um composto com aplicação efetiva sobre a redução de *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. de carcaças de aves.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS EM ÁGUA DE *CHILLER* ARTIFICIALMENTE CONTAMINADA

Os compostos dicloro isocianurato de sódio e ácido láctico foram submetidos ao teste em água de *chiller* artificialmente contaminada com as cepas padrões de *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. A escolha dos compostos justificou-se pelo fato de que o ácido láctico é um composto de uso permitido nos Estados Unidos e com estudos na União Europeia potencializando seus efeitos na descontaminação de carcaças de frango (FSIS, 2012; EFSA, 2006). Já o dicloro isocianurato de sódio é um composto de baixo custo, quimicamente estável e de reação lenta com a matéria orgânica (BRASIL, 2015). Os resultados obtidos para os compostos estão demonstrados na Tabela 20.

De acordo com os dados obtidos, tanto o ácido láctico na concentração de 20 g/L quanto o dicloro isocianurato de sódio na concentração de 60 ppm (mg/L) reduziram o crescimento das cepas padrões de *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* presentes na água do *chiller*, se mostrando eficientes. Os resultados reforçaram a funcionalidade destes compostos na redução de contaminações microbiológicas em sistemas de resfriamento.

Tabela 20 – Aplicação de Dicloro e Ácido Láctico em Água de *Chiller* Artificialmente Contaminada.

Cultura	Dicloro (60 mg/L)	Ácido Láctico (20 g/L)	Controle Positivo (água de <i>Chiller</i> )
<i>Salmonella</i> Heidelberg (ATCC 8326)	ND	ND	4,2 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
	ND	ND	5,0 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
	ND	ND	5,7 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	ND	ND	6,3 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
	ND	ND	5,9 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
	ND	ND	5,4 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)	ND	ND	6,8 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
	ND	ND	7,2 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL
	ND	ND	5,8 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL

UFC/mL: Unidade formadora de colônia por mililitro.

Obs.: ND – Crescimento Não Detectado.

Ainda, os compostos em questão demonstraram que, mesmo diante da carga orgânica presente na água de resfriamento, ambos não perderam sua efetividade, revelando também sua estabilidade.

Yang, Li e Johnson (2001) e Stopforth et al. (2007) demonstraram a eficácia do cloro na inativação de *Salmonella* spp. na água de *chiller*, mas não em carcaças. Os efeitos da água de *chiller* clorada sobre *Campylobacter* spp. foi maior do que o efeito sobre *Salmonella* spp. Foram observadas ainda pequenas reduções em número e prevalência de *Campylobacter* spp. em carcaças quando a água de *chiller* foi clorada.

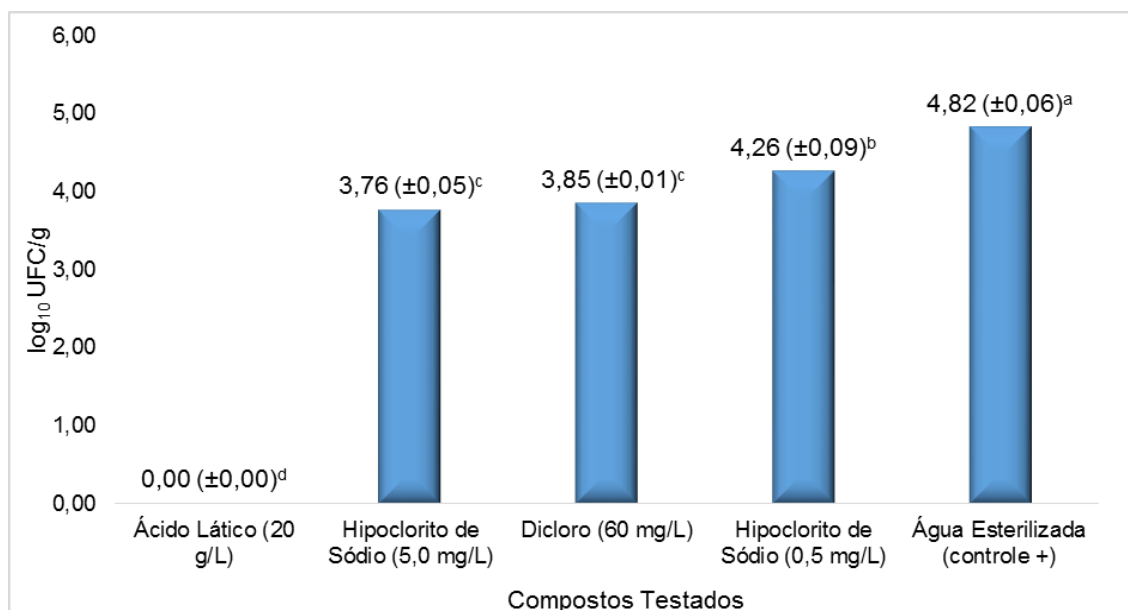
## 5.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) SOBRE A REDUÇÃO DE *Salmonella* spp., MESÓFILOS TOTAIS E ENTEROBACTÉRIAS EM CARNE DE FRANGO

As análises de mesófilos totais e enterobactérias contempladas no presente estudo foram motivadas pela necessidade de atendimento da Circular nº 12 de 13/04/2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a qual estabelece o monitoramento das contagens destes micro-organismos antes e depois do sistema de pré resfriamento das carcaças de aves (BRASIL, 2007).

A análise de variância revelou que houve diferença estatística entre os compostos testados em relação aos micro-organismos avaliados ao nível de 95% de confiabilidade. As Figuras 12, 13 e 14 apresentam os resultados obtidos para as contagens de *Salmonella* spp., mesófilos e enterobactérias após o tratamento estatístico dos dados através do Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 5.6.1 Contagem de *Salmonella* spp.

A Figura 12 ilustra as reduções das contagens de *Salmonella* spp. em coxa de frango contaminada após a imersão da carne nos compostos testados.



Médias  $\pm$  (desvio padrão) seguidos por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

**Figura 12 – Contagem de *Salmonella* spp.**

Em relação à amostra controle positivo, evidenciou-se que houve a redução de 1,06  $\log_{10}$  UFC/g de *Salmonella* spp. após a imersão da carne de frango contaminada em solução contendo 5,0 mg/L de hipoclorito de sódio. Para o dicloro a 60 mg/L a redução foi de 0,97  $\log_{10}$  UFC/g, enquanto que para o hipoclorito de sódio a 0,5 mg/L a redução foi de 0,56  $\log_{10}$  UFC/g. Pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, a solução de ácido láctico foi a que apresentou melhor efetividade, reduzindo o crescimento de *Salmonella* spp. em 4,82  $\log_{10}$  UFC/g e diferindo estatisticamente das demais soluções testadas. Em seguida, constatou-se que os compostos hipoclorito de sódio (5,0 mg/L) e dicloro (60 mg/L) apresentaram efetividade na redução de *Salmonella* spp., contudo não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram dos demais compostos. Ainda, evidenciou-se que o hipoclorito de sódio (0,5 mg/L) reduziu a contagem de *Salmonella* spp. e diferiu da amostra controle, mas em comparação aos demais compostos, a redução ocasionada pelo composto foi pouco expressiva.

Chaine et al. (2013), ao avaliarem a efetividade de aplicação de vapor a 100 °C por 8 minutos, ácido láctico a 5% por 1 minuto e a combinação destes dois tratamentos na inativação de *Salmonella* Enteritidis e *Campylobacter jejuni* inoculados sobre pele de frango evidenciaram que o tratamento com vapor e vapor combinado com ácido láctico resultaram em reduções de 6 e 5 logs UFC/cm<sup>2</sup> de

*Salmonella* Enteritidis e *Campylobacter jejuni*, respectivamente. Ainda, após 07 dias de estocagem a 4 °C, o ácido láctico teve um efeito persistente sobre o crescimento de patógenos, resultando em reduções de 3,8 log UFC/cm<sup>2</sup> tanto para *Salmonella* Enteritidis quanto para *Campylobacter jejuni*.

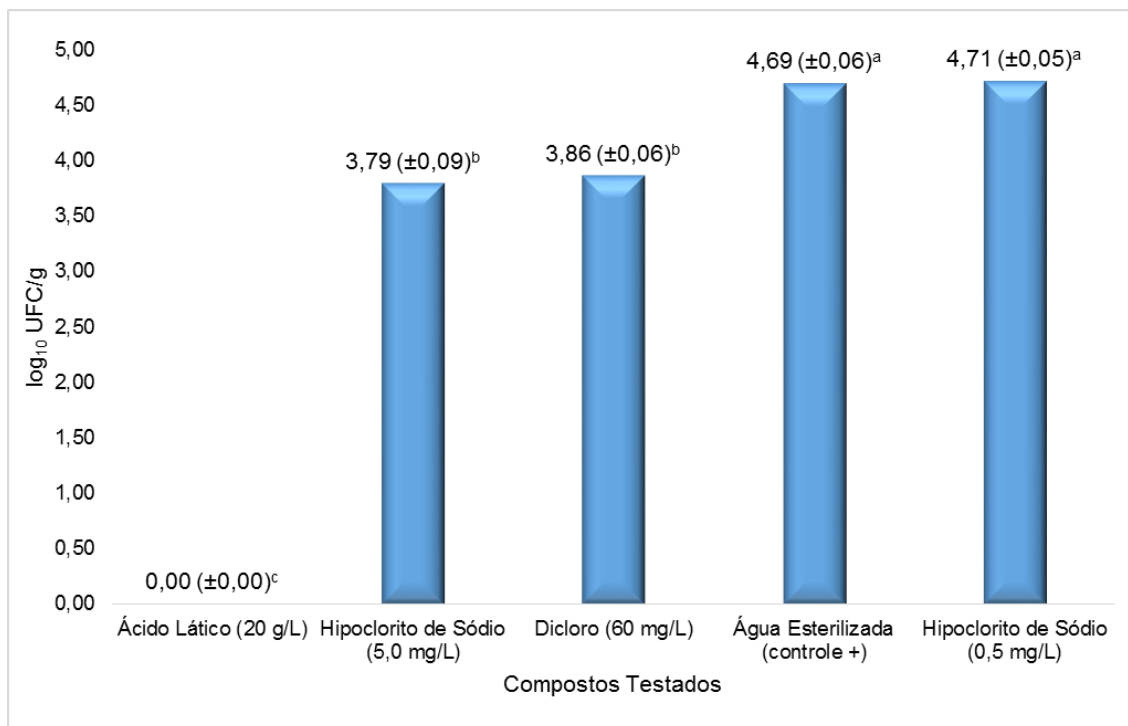
Sarjit e Dykes (2015), ao testarem fosfato trissódico (8, 10 e 12%) e hipoclorito de sódio (40, 50 e 60 ppm) contra *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. em carne de pato e frango, simulando as condições do sistema de resfriamento, observaram que o hipoclorito de sódio reduziu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (~0.2–1.5 log UFC/cm<sup>2</sup>) tanto nas carcaças de frango quanto nas carcaças de pato.

Tondo e Decol (2015) avaliaram uma cepa de *Salmonella* Heidelberg quanto à resistência em diferentes concentrações de cloro. Os resultados obtidos a partir da exposição a baixas concentrações de hipoclorito de sódio (1,5 a 2,0 ppm) demonstraram reduções que variaram de 0,04 logs (após 15 minutos de exposição a 2,0 ppm a pH 7,5) a 2,34 logs (após 45 minutos de exposição a 2,0 ppm a pH 4,5). A partir da utilização de uma maior concentração de hipoclorito de sódio, foi observado uma maior redução, em torno de 1,59 logs (após 1 minuto de exposição a 150 ppm a pH 4,5) até a inativação total do micro-organismo pela utilização de 200 ppm, em diferentes tempos e pHs testados.

#### 5.6.2 Contagem de Mesófilos Totais

A Figura 13 ilustra as reduções das contagens de mesófilos totais em coxa de frango contaminada após à imersão da carne nos compostos testados.





Médias  $\pm$  (desvio padrão) seguidos por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

**Figura 13 – Contagem de Mesófilos Totais**

A redução observada para mesófilos foi de 0,9  $\log_{10}$  UFC/g para a solução de hipoclorito de sódio a 5,0 mg/L em relação à amostra controle positivo e 0,83  $\log_{10}$  UFC/g para a solução de dicloro isocianurato de sódio a 60 mg/L. Não houve redução para a solução de hipoclorito de sódio 0,5 mg/L em relação à amostra controle positivo.

Logo, para o grupo dos mesófilos, a solução de ácido láctico também apresentou a melhor efetividade, reduzindo o crescimento de mesófilos em 4,69  $\log_{10}$  UFC/g e diferindo estatisticamente das demais soluções testadas. Ainda, constatou-se que os compostos hipoclorito de sódio (5,0 mg/L) e dicloro (60 mg/L) apresentaram efetividade na redução de mesófilos, contudo não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram dos demais compostos testados.

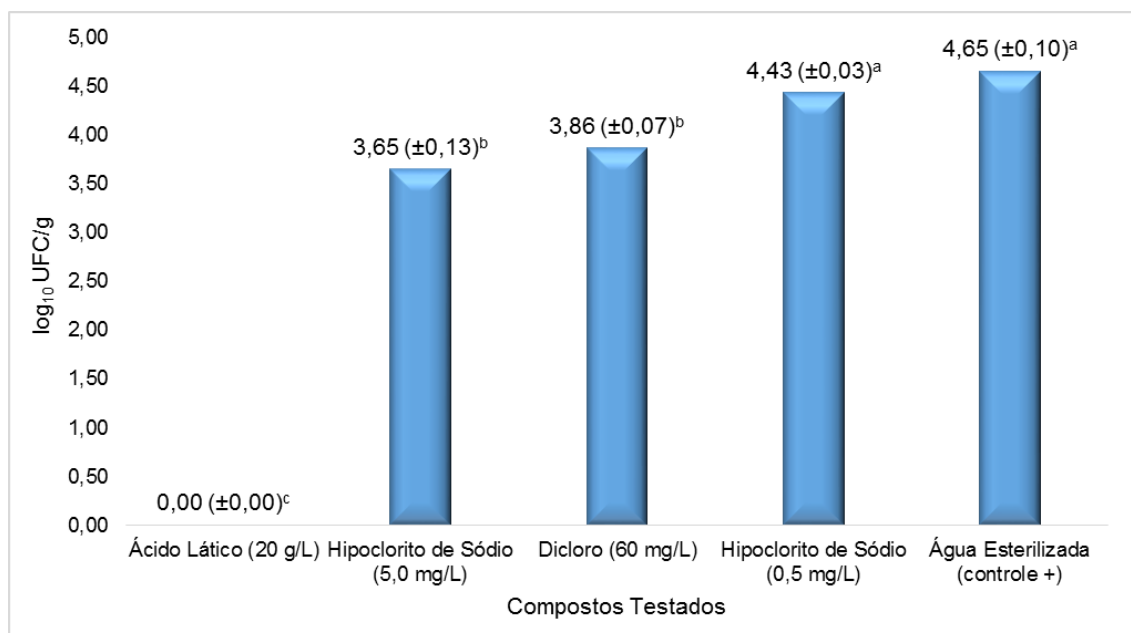
Silva, Sores e Costa (2001), ao sanitizarem carcaças de aves destinadas ao consumo humano com soluções contendo 1,0 ou 2,0% de ácido láctico ou ácido acético e suco de limão integral e diluído a 50%, observaram que todos os tratamentos apresentaram eficiência na redução da contaminação inicial das carcaças de frango por bactérias mesófilas, bolores e leveduras, número mais provável de coliformes totais e fecais e pesquisa de *Salmonella* spp.

Pokharel et al. (2015) pulverizaram ácido láctico a 4,5% e pressão mínima de 15 psi sobre carcaças a fim de verificar a eficácia deste composto contra a redução de *Escherichia coli*, coliformes totais e mesófilos de vários cortes cárneos. Como resultados, o ácido láctico reduziu *Escherichia coli*, coliformes totais e mesófilos, na ordem de 0,15; 0,41 e 1,96 logs, respectivamente.

Chaine et al. (2013) constataram que a aplicação de vapor a 100 °C por 8 minutos associada com ácido láctico a 5% por 1 minuto reduziram significativamente a contagem de mesófilos aeróbios durante a estocagem de pele de frango a 4 °C por sete dias.

### 5.6.3 Contagem de Enterobactérias

A Figura 14 ilustra as reduções das contagens de enterobactérias em coxa de frango contaminada após à imersão da carne nos compostos testados.



Médias ± (desvio padrão) seguidos por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

**Figura 14 – Contagem de Enterobactérias**

Os resultados obtidos revelaram uma redução na contagem de enterobactérias de 1,0 log<sub>10</sub> UFC/g em relação à amostra controle positivo para a solução de hipoclorito de sódio a 5,0 mg/L, 0,79 log<sub>10</sub> UFC/g para a solução de

dicloro a 60 mg/L e 0,22 log<sub>10</sub> UFC/g para a solução de hipoclorito de sódio 0,5 mg/L. Novamente o ácido láctico diferiu estatisticamente das demais soluções, reduzindo 4,65 log<sub>10</sub> UFC/g de enterobactérias em relação à amostra controle positivo e revelando seu espectro de ação frente ao grupo das enterobactérias. Os compostos hipoclorito de sódio (5,0 mg/L) e dicloro (60 mg/L) apresentaram efetividade na redução de enterobactérias, contudo não diferiram estatisticamente entre si, mas diferiram frente aos demais compostos testados.

Anang et al. (2010) testaram diferentes concentrações (0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%) de lauricidina (contendo 1% de ácido láctico) e ácido láctico em meio peito de frango, mergulhando-os nas soluções por 10, 20 e 30 minutos. Em seguida, estocaram a carne de frango a 4 °C por 14 dias. Para as amostras de meio peito tratadas com ácido láctico houveram reduções na contagem total de 0,53 a 2,36 log UFC/g. E para enterobactérias, as reduções ficaram entre 0,59 a 2,18 log UFC/g. Estes autores referenciaram que o ácido láctico revelou grande potencial para ser usado como composto sanitizante na redução da população de micro-organismos de ocorrência natural na carne de frango e pode ser explorado comercialmente como composto para estender o *shelf life* de carne de frango.

Meredith et al. (2013) avaliaram o efeito da aplicação de vários compostos antimicrobianos na redução de *Campylobacter* spp., contagem total de viáveis e enterobactérias de cloacas de aves. Apenas a lavagem das cloacas com ácido láctico a 5% apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) de contagens de *Campylobacter* spp. das carcaças, sendo a redução de 0,66 log UFC/cm<sup>2</sup>.

#### 5.6.4 Efetividade dos Compostos

Os resultados obtidos para os compostos testados na carne de frango reforçam a necessidade de reavaliar a estratégia de intervenção atualmente utilizada nos frigoríficos de aves, notadamente sobre o uso do hipoclorito de sódio. Em sistemas de resfriamento de carcaças de aves, ele é a forma de intervenção antimicrobiana permitida, principalmente em virtude do seu baixo custo. Contudo, ele possui restrições relacionadas à elevada reação com a matéria orgânica presente na água de resfriamento, ocasionando a perda de eficiência deste composto e sendo

necessário um sistema de monitoramento constante para manutenção da concentração de cloro.

Acrescenta-se ainda que os resultados obtidos para o hipoclorito de sódio a 5,0 ppm (mg/L) revelaram que este composto não foi capaz de eliminar os micro-organismos presentes na carne de frango.

Neste sentido, enfatiza-se a importância e a necessidade das autoridades nacionais, por meio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, argumentarem tecnicamente frente às exigências dos países importadores, como a União Aduaneira, por exemplo, pois a cloração máxima permitida pelos países membros (0,3 – 0,5 ppm) não é suficiente para reduzir micro-organismos, notadamente os patogênicos, tornando vulnerável o fornecimento de alimentos seguros, em detrimento às premissas nacionais e internacionais.

O dicloro isocianurato de sódio, por sua vez, não foi o composto com melhor eficácia. Contudo, revelou ser uma alternativa para os frigoríficos de aves, uma vez que as reduções observadas pelo seu uso foram significativas em comparação às amostras controles e ao hipoclorito de sódio a 0,5 ppm (mg/L).

Os resultados demonstraram que a atuação do dicloro isocianurato de sódio foi mais efetiva quando aplicado apenas em água de *chiller* contaminada do que na coxa e sobrecoxa de frango contaminada, sugerindo que o composto pode perder parte da sua eficiência quando aplicado diretamente na matriz cárnea, possivelmente pela sua reação com os componentes da carne, notadamente proteínas e gorduras.

O tratamento com ácido láctico na carne de frango contaminada foi o único que apresentou inibição completa de todos os micro-organismos avaliados, diferindo-se estatisticamente dos demais compostos testados, e revelando ser uma alternativa para melhorar a qualidade microbiológica dos lotes de aves que já chegam contaminados aos frigoríficos.

Sugere-se, ainda, que sejam conduzidos novos estudos com a finalidade de otimizar a concentração de uso, visto que no estudo em questão os melhores resultados foram obtidos na concentração de ácido láctico de 20 g/L (1,7%). Logo, conhecendo-se e avaliando-se as variáveis do sistema de resfriamento é possível estudar a efetividade de concentrações inferiores do ácido, objetivando tornar o seu uso viável economicamente para os frigoríficos de aves.

## 5.7 VIABILIDADE ECONÔMICA DOS COMPOSTOS TESTADOS

O uso pretendido dos compostos ácido lático e dicloro no presente trabalho foi em sistema de resfriamento, especificamente no *chiller* final. Logo, levando-se em consideração a efetividade destes compostos e também do ácido peracético, o qual apresentou amplo espectro de ação sobre a inibição do crescimento das cepas de *Salmonella* spp. isoladas do frigorífico, avaliou-se o custo de cada produto baseado no volume necessário para suprir a demanda do *chiller* com retenção de 128 mil aves / hora.

O litro do ácido lático custa em média R\$ 13,40 e considerando o volume do *chiller* (água de enchimento + água de renovação) de 179.500 litros e a concentração do produto de 20 g/L, o gasto diário estimado fica em R\$ 54.899,00. Já o ácido peracético custa em média R\$ 7,61 por litro. Considerando o volume de água demandado no *chiller* e a concentração do produto de 10 g/L, o gasto diário estimado fica em R\$ 91.061,26. O dicloro, por sua vez, custa em média R\$ 10,40 por quilograma do produto. Considerando o volume demandado no *chiller* e a concentração do produto de 60 mg/L, o gasto diário estimado fica em R\$ 578,97.

É sabido que os compostos clorados são economicamente viáveis, contudo a efetividade destes compostos é influenciada por diversos fatores, os quais já foram mencionados no presente estudo. Já os ácidos orgânicos demandam de concentrações mais elevadas para serem efetivos, o que encarece a sua utilização.

Há outras etapas dentro do processamento de aves nas quais podem ser utilizados compostos clorados e ácidos orgânicos, como chuveiros de lavagem, sendo que nestes o volume de água é bem menor em comparação ao *chiller*. Logo, sugere-se a avaliação dos compostos testados no presente trabalho em outros pontos, notadamente para os ácidos orgânicos, os quais revelaram grande efetividade, porém a viabilidade econômica destes ácidos torna a sua utilização onerosa para as indústrias.

## 6 CONCLUSÃO

Dentre as 102 cepas de *Salmonella* spp. isoladas a partir de carcaças de aves, a identificação das cepas por PCR revelou que 95 (93,1%) foram identificadas como *Salmonella* spp., sendo que 07 cepas (6,9%) apresentaram reação negativa.

À exceção do dióxido de cloro e do ácido tricloro isocianúrico, os demais compostos inibiram o crescimento das cepas padrões de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*, revelando concentrações inibitórias mínimas satisfatórias diante da resistência das cepas avaliadas. Entre os ácidos orgânicos, ácido láctico e ácido peracético se mostraram efetivos na inibição das cepas de *Salmonella* spp. isoladas do frigorífico, sendo que o ácido peracético inibiu 100% das cepas, e o ácido láctico inibiu 97,89% das cepas isoladas.

O ácido láctico e o dicloro isocianurato de sódio tiveram seus efeitos confirmados quando aplicados em água de *chiller* artificialmente contaminada, revelando seu amplo espectro de ação. Além disso, a efetividade destes compostos também foi observada no tratamento de carne de frango contaminada. O dicloro isocianurato de sódio foi capaz de reduzir a contaminação por *Salmonella* spp., mesófilos totais e enterobactérias. Já o ácido láctico demonstrou grande efetividade frente a redução de *Salmonella* spp., mesófilos totais e enterobactérias, diferindo-se estatisticamente dos demais compostos testados.

Os resultados obtidos no presente estudo podem nortear discussões para regulamentar o uso do ácido láctico, o qual já é prática adotada em outros países como nos Estados Unidos da América, e do dicloro isocianurato de sódio, como possíveis coadjuvantes de tecnologia no abate de aves.

## REFERÊNCIAS

ANANG, D. M. et al. Inhibitory effects of lactic acid and lauricidin on spoilage organisms of chicken breast during storage at chilled temperature. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 1, p. 152-159, 2010.

ANDRADE, N.J., PINTO, C. L., ROSADO, M. S. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008. 410 p.

BARBOSA, Firmino José Ferreira et al. Sistema Alternativo de Criação de Galinhas Caipiras. Embrapa, versão eletrônica, nov. 2007. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/SistemaAlternativoCriacaoGalinhaCaipira/Mercado.htm>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

BAUERMEISTER, L.J. et al. The microbial and quality properties of poultry carcasses treated with peracetic acid as an antimicrobial treatment. **Poultry Science**, v.87, n.11, p. 2390–2398, jun. 2008.

BELTRAME, Cezar Augusto. **Avaliação da eficiência de sanitizantes utilizados pelas indústrias de alimentos**. 2009. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, 2009.

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

BOLDER, Nico. M. Microbial challenges of poultry meat production. **World's Poultry Science Journal**, v.63, n.3. p. 401–411, set. 2007.

BOLDRIN, Melissa C. F. **Uso de Ácidos Orgânicos na Descontaminação de Carcaças Bovinas**. 2012. 41f. Seminário (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em:<  
[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES) >. Acesso em: 03 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952**. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Disponível em:<  
[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf)>. Acesso em: 26 jul. 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. **Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves**. Disponível em:<  
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 26 jul. 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 70, de 10 de outubro de 2003. **Dispõe sobre o Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de Salmonella sp. em Carcaças de Frangos e Perus**. Disponível em:<  
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 26 jul. 2014.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 668 de 19/09/2006. **Diretrizes para preparação de Plano de APPCC (HACCP) para o processo de abate de aves**. Brasília: 2006. 3 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 12 de 13/04/2007. **Padronização de procedimentos de controle da fiscalização de estabelecimentos produtores de carne de aves e ovos e das auditorias da DICA/CGI/DIPOA nos estados**. Brasília: 2007. 16p

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular nº 1243/2008/CGPE/DIPOA de 31 de dezembro de 2008. **África do Sul. Encaminha modelo de Certificado Sanitário para exportação de carne aves, incluindo carne mecanicamente separada, destinado à África do Sul. Esta circular cancela a de nº 1206/2008/CGPE/DIPOA**. Brasília: 2008. 5 p.



\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Circular n° 818/2010/CGPE/DIPOA de 26 de novembro de 2010. **Normas Russas Aves. Normas referentes a produção e circulação da carne de aves. Aditamento Circular 681/2010/CGPE/DIPOA.** Brasília: 2010. 2 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ofício Circular n° 02 Micro/CGAL/2010, de 26/04/2010 – **Métodos Alternativos Aprovados** – MAPA.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Memorando n° 381/CGI/DIPOA/2013 de 29 de agosto de 2013. **Diretrizes para Atendimento da Legislação da União Aduaneira.** Brasília: 2013. 18 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aves.** Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves> >. Acesso em: 12 mar. 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Frigoríficos e Matadouros. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/frigorificos> >. Acesso em: 12 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças Transmitidas por Alimentos.** Disponível em:< <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

BRASIL. Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA. **Avicultura Brasileira.** Disponível em:< [http://www.ubabef.com.br/a\\_avicultura\\_brasileira/historia\\_da\\_avicultura\\_no\\_brasil](http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil)>. Acesso em: 21 jul. 2014.

\_\_\_\_\_. Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA. **Cortes de Frango.** Disponível em:< <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/cortes>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

\_\_\_\_\_. Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA. **Relatório Anual 2015.** Disponível em:< [http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual\\_UBABEF\\_2015\\_DIGITAL.pdf](http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf)>. Acesso em: 15 nov. 2015.

\_\_\_\_\_. Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA. **O Brasil Avícola.** Disponível em:< <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/resumo>>. Acesso em: 15 nov. 2015.

BRASIL. Avisite. **Os 25 Principais Importadores da Carne de Frango Brasileira em 2014**. Disponível em: < <http://www.avisite.com.br/noticias/?codnoticia=15655>>. Acesso em 16 nov. 2015.

BRASIL. **Carnes Preferidas para Churrasco – Frango**. Disponível em: < <http://cursodechurrasqueiro.com/carnes-preferidas-para-churrasco-frango/>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

BRASIL. **Como escolher o composto clorado ideal para tratar sua piscina**. Disponível em: < [http://www.hidroall.com.br/br/industrial/sanitizantes/produtos/caminhoes-pipa/item/download/56\\_444444e716f8125da9704da4a4b13568](http://www.hidroall.com.br/br/industrial/sanitizantes/produtos/caminhoes-pipa/item/download/56_444444e716f8125da9704da4a4b13568) >. Acesso em: 15 nov. 2015.

BRASIL. **Ecocloro. Soluções em Dióxido de Cloro**. Disponível em: < <http://www.ecoclo2ro.com.br/#!/di-xido-de-cloro/jbegc>>. Acesso em: 04 jul. 2015.

BRASIL. **Estados membros da UE**. Disponível em: <[http://eeas.europa.eu/delegations/cape\\_verde/what\\_eu/eu\\_memberstates/index\\_pt.htm](http://eeas.europa.eu/delegations/cape_verde/what_eu/eu_memberstates/index_pt.htm)>. Acesso em 04. Abr. 2016.

BRASIL. **O mundo do processamento de aves**. Disponível em: < <https://marel.com/files/pdf/world-of-stork-poultry-br.pdf?ind=poultry> >. Acesso em: 12 mar. 2016.

BRASIL. **União Euroasiática**. Disponível em: <[https://pt.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%A3o\\_Eurasi%C3%A1tica](https://pt.wikipedia.org/wiki/Uni%C3%A3o_Eurasi%C3%A1tica)>. Acesso em 04. Abr. 2016.

BRIDI, Ana Maria. **Qualidade da carne para o mercado internacional**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2004.

BUNCIC, Sava; SOFOS, John. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food Research International**, v.45, n.2, p. 641–655, mar. 2012.

BURIN, Raquel Cristina Konrad; SILVA, Abelardo; NERO, Luís Augusto. Influence of lactic acid and acetic acid on *Salmonella* spp. growth and expression of acid tolerance-related genes. **Food Research International**, v. 64, p. 726-732, 2014.

CARDOSO, Ana Lúcia Sicchiroli Paschoal et al. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 144-150, jan-fev. 2005.

CASTILLA, Karina S. **Deteção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de *Salmonella* Enteritidis utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. 2003. 78f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CHAINED, Aline et al. Effect of steam and lactic acid treatments on the survival of *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* inoculated on chicken skin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 3, p. 276-282, 2013.

COLLA, Flávia L. et al. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em Diferentes Pontos da Tecnologia de Abate de Frangos de Corte. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.79, n.4, p. 603-606, abr. 2012.

COSTA, Solange Alves da Silva. **Efetividade antimicrobiana e estabilidade física de soluções de ácido peracético no processo de desinfecção terminal**. 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia), Universidade de Taubaté. Taubaté, São Paulo, 2010.

DOMINGUES, Paulo Francisco. **Desinfecção e desinfetantes**. Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP. Disponível em: <<http://www.fm.vz.unesp.br/paulodomingues/graduacao/aula5-texto.pdf>>. Acesso em: 07 out. 2015.

DOYLE, Michael P.; ERICKSON, Marilyn C. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. **Poultry Science**, v.85, n.6, p. 960-973, mar. 2006.

EFSA. European Food Safety Authority. Opinion from the Scientific Panel on Biological Hazards on the evaluation of the efficacy of L (+) Lactic acid for carcass decontamination. **The EFSA Journal**, v.342, p. 1-6, mar. 2006.

\_\_\_\_\_. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of peroxyacetic acid solutions for reduction of pathogens on poultry carcasses and meat. **The EFSA Journal**, v.12, n.3, mar. 2014.

FAJARDO, Dulce M. R. **Incidenca y fuentes de contaminación de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y bacterias indicadoras en zanahoria a lo largo del cultivo, acondicionamiento y empaçado en dos empresas productoras.** 2009. 144 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República, Centro Universitario Querétaro. México, 2009.

FERREIRA, Antônio J. P; QUEIROZ, Livia M. S. Efeito do desinfetante a base de NaDCC (dicloro isocianurato de sódio) sobre a redução de *Salmonella Enteritidis* em ovos embrionados infectados experimentalmente. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, Bernadette D. G. M.; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos.** 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p.

FRATAMICO, Pina M. Comparison of culture, polymerase chain reaction (PCR), TaqMan *Salmonella*, and Transia Card *Salmonella* assays for detection of *Salmonella* spp. in naturally-contaminated ground chicken, ground turkey, and ground beef. **Molecular and cellular probes**, v. 17, n. 5, p. 215-221, 2003.

FREITAS, Camila Guimarães. **Adaptação da técnica de PCR múltipla para a identificação de *Salmonella* sp. e dos sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium em carcaças e miúdos de aves comercializados no Distrito Federal.** 2008. 65 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal), Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2008

FSIS. Food Safety and Inspeccion Service. FSIS Directive 7120.1, **Safe and Suitable Ingredients Used in The Production of Meat, Poultry, and Egg Products**, Revision 14, dated March 22, 2012. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/7120.1.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003 - 2007 (N° 47) to the White-Kauffmann -Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26-29, 2010.

JACULI. Marcos Fernando de Lima. **Avaliação do uso de compostos saneantes em serviços de alimentação coletiva.** 2009. 39 f. Monografia (Especialização em Qualidade de Alimentos), Universidade de Brasília. Brasília, DF, 2009.

JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) n° 2073/2005 da Comissão de 15 de novembro de 2005**. Relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios.

ISO 6579. **Microbiologia de Alimentos e alimentação de animais - Método Horizontal para a detecção de *Salmonella* spp.** 4. ed. 2002.

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

KANG, Seoknam et al. Effect of organic acids on microbial populations and *Salmonella* Typhimurium in pork loins. **ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES**, v. 16, n. 1, p. 96-99, 2003.

KUANA, S. L. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. In: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. DI.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. A. **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas: Facta, 2009. 1.104 p.

LEISTNER, Lothar. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n.1-3, p. 181–186, abr. 2000.

LUDTKE, C. B. et al. **Abate Humanitário de Aves**. WSPA – Sociedade Mundial de Proteção Animal. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em:<  
[www.agricultura.gov.br/.../Abate%20H\\_%20de%20Aves%20-%20WSP...](http://www.agricultura.gov.br/.../Abate%20H_%20de%20Aves%20-%20WSP...)>. Acesso em: 15 nov. 2015

LUES, Jan Frederick Rykers; THERON, Maria Magdalena. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains in vitro. **Foodborne pathogens and disease**, v. 9, n. 12, p. 1126-1129, 2012.

MACEDO, Jorge Antônio Barros de. O processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados em função do pH e a Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde. In: **Anais do XLIV Congresso Brasileiro de Química**. 2004.

MACHADO, Taís Raquel Marcon et al. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 69, n. 4, p. 475-481, 2010.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v.45, n.2, p. 713–721, mar. 2012.

MASSAGUER, Pilar R. **Microbiologia dos Processos Alimentares**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2005. 258 p.

MENDES, A. A. SANIDADE AVÍCOLA – FORTALEZA NACIONAL, 2014, Brasília. **Panorama da Avicultura Nacional e Perspectivas do Setor**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/PNSA/Reuni%C3%A3o%20PNSA\\_%20\\_Sanidade%20Av%C3%ADcola-Fortaleza%20Nacional\\_/2%20Dr\\_%20Ariel%20-%20Panorama%20da%20avicultura%20nacional%20e%20perspectivas%20para%20o%20setor.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/PNSA/Reuni%C3%A3o%20PNSA_%20_Sanidade%20Av%C3%ADcola-Fortaleza%20Nacional_/2%20Dr_%20Ariel%20-%20Panorama%20da%20avicultura%20nacional%20e%20perspectivas%20para%20o%20setor.pdf)>. Acesso em: 14 nov. 2015.

MEREDITH, H. et al. An investigation of the immediate and storage effects of chemical treatments on *Campylobacter* and sensory characteristics of poultry meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 2, p. 309-315, 2013.

MIR, I.A. et al. Isolation, serotype diversity and antibiogram of *Salmonella enterica* isolated from different species of poultry in India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, n.7, p. 561-567, jul. 2015.

MORETRO, Trond et al. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 532-544, 2012.

MURRO, Marcos. O uso de antissépticos e Desinfetantes. **Avicultura**. 2012. Disponível em: <<https://pt.engormix.com/MA-avicultura/industria-carne/artigos/uso-anti-septicos-desinfetantes-t334/471-p0.htm>>. Acesso em: 10 set. 2015.

NAGEL, G. M. et al. *Salmonella* and *Campylobacter* reduction and quality characteristics of poultry carcasses treated with various antimicrobials in a post-chill immersion tank. **International Journal of Food Microbiology**, v.165, n.3, p. 281–286, ago. 2013.

NASCIMENTO, Gisele. Mendanha. **Uso de desinfetantes em produção de aves**. 2013. 30 f. **Seminário (Doutorado em Saúde Animal), Universidade Federal de Goiás**, Goiânia, GO, 2013.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility tests; Approved Standard - Eighth NCCLS**. Document M2-A8. Wayne, Pennsylvani, USA, 2003.

PAIÃO, F.G. et al. Detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium in naturally infected broiler chickens by a multiplex PCR-based assay. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.1, p. 37-41, mar. 2013.

PANDINI, J.A. et al. **Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil.** Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) Cascavel, PR, 2015.

POKHAREL, S. et al. In-plant validation study to determine the efficacy of lactic acid as an antimicrobial intervention on beef heads and variety meats. **Meat Science**, v. 112, p. 167, 2016.

ROBINSON, Sam. **The Big Five: Most Common *Salmonella* Strains in Foodborne Illness Outbreaks.** Publicado em Agosto de 2013. Disponível em: <<http://www.foodsafetynews.com/2013/08/the-five-most-common-salmonella-strains/#.Vq4JlLSnIV>>. Acesso em: 31 jan. 2016.

RODRIGUES, D. P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. **Simpósio Internacional sobre Salmonelose Aviária.** Rio de Janeiro, Brasil. Rio Othon Palace Hotel - UBABEF. 28-30 Jun. 2011.

RUI, Bruno Rogério et al. Principais métodos de desinfecção e desinfetantes utilizados na avicultura: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n. 16, jan. 2011.

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 5, p. 363-370, 1992.

SARJIT, Amreeta; DYKES, Gary A. Trisodium phosphate and sodium hypochlorite are more effective as antimicrobials against *Campylobacter* and *Salmonella* on duck as compared to chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 63-69, 2015.

SCANDOLARA, Aline et al. Descontaminação de Carcaças Suínas com Ácidos Orgânicos Comerciais, Solução Salina Acidificada e Luz Ultravioleta. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, v. 3, n. 2, p. 157-166, jul./dez. 2012.

SCUR, Mayara Camila et al. Atividade antimicrobiana de desinfetantes comerciais frente a micro-organismos patogênicos de importância avícola. **Acta Iguazu**, Cascavel, v.3, n.3, p. 1-10, 2014

SHINOHARA, Neide Kazue Sakugawa et al. *Salmonella* spp., Importante Composto Patogênico Veiculado em Alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p. 1675-1683, set-out. 2008.

SILVA, João Andrade. Micro-organismos patogênicos em carne de frango. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n. 58, p. 9-14, out. 1998.

SILVA, João Andrade; SOARES, Leonardo Ferreira; COSTA, Elizabete Lourenço da. Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão. **Revista TeC Carnes**, v.3, n.1, p. 19-26, 2001.

SILVA, João Andrade et al. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 100, p. 97-101, 2002.

SILVA, Neusely et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológicas de Alimentos**. 4.ed. São Paulo: Varela, 2010. 624 p.

SIMÕES, Ricardo Scherer. **Uso de probióticos e ácidos orgânicos em frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg**. 2015. 58 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência Animal), Universidade Federal do Paraná, Patolína, PR, 2015.

SOARES, Humberto. **Top 5: Sorotipos de *Salmonella* mais relacionados a surtos alimentares**. Publicado em Outubro de 2013. Disponível em: <<http://foodsafetybrazil.org/top-5-sorotipos-de-salmonella-mais-relacionados-a-surtos-alimentares/>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

STATISTICA versão 12.0 (Statsoft Inc., USA).

STOPFORTH, J. D. et al. Validation of individual and multiple-sequential interventions for reduction of microbial populations during processing of poultry carcasses and parts. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 6, p. 1393-1401, 2007.

TECHNICAL REGULATION OF THE CUSTOMS UNION. **Concerning Safety of Food Products**. TR CU 021/2011. APPROVED by Decision No. 880 of the Customs Union Commission dated 9 December 2011.



TONDO, Eduardo Cesar; DECOL, Luana Tombini. **Avaliação da resistência ácida, térmica e a diferentes concentrações de cloro de uma cepa de *Salmonella Heidelberg***. 2015. 15 f. Trabalho Técnico, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2015.

TRABULSI, Luiz Rachid, ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 718 p.

VAN DER FELLS-KLERX, H. J. et al. Prevalence of *Salmonella* in the broiler supply chain in the Netherlands. **Journal of Food Protection**, v.71, n.7, p.1974–1980, ago. 2008.

VIEIRA, Sérgio Luiz. **Qualidade visual de carcaças de frangos de corte: uma abordagem a partir do ambiente de produção**. 2. ed. São Paulo: Sérgio Luiz Vieira, 2009. 88 p.

VIOLA, Eduardo Spillari. **Uso de acidificantes em dietas de frangos de corte: resíduos no trato digestivo e efeitos sobre o desempenho animal e morfologia intestinal**. 2006. 196 f. Dissertação (Doutorado em Zootecnia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2006.

VIVIAN, Ricardo Campos. **Avaliação da formação de biofilme e sensibilidade ao ácido peracético por *Salmonella* spp. isolada de abatedouro avícola**. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2014.

VON RÜCKERT, D. A. S. et al. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.2, p. 326-330, abr. 2009.

WHO. Microbiological Risk Assessment, Series 19. ***Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat**. Meeting Report. Disponível em:<  
<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA19.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

YANG, Hong; LI, Yanbin; JOHNSON, Michael G. Survival and death of *Salmonella* Typhimurium and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling. **Journal of Food Protection**, v.64, n.7, p. 770–776, jun. 2001.