

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

CLÁUDIA WALUS STOCCO

CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO EM FRIGORÍFICO

DISSERTAÇÃO

PONTA GROSSA

2017

CLÁUDIA WALUS STOCCO

CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO EM FRIGORÍFICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção, do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Produção, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Ponta Grossa, Área de Concentração: Gestão da Inovação Agroindustrial – GIA.

Orientador: Profa. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt

PONTA GROSSA

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Departamento de Biblioteca
da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa
n.20/17

S864 Stocco, Cláudia Walus

Controle de qualidade microbiológico em frigorífico. / Cláudia Walus Stocco.
2017.

85 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Tecnológica Federal do
Paraná. Ponta Grossa, 2017.

1. Micro-organismos patogênicos. 2. Enterobactérias. 3. Carne - Indústria. 4.
Engenharia de produção. I. Bittencourt, Juliana Vitória Messias. II. Universidade
Tecnológica Federal do Paraná. III. Título.

CDD 670.42



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação Nº 297/2017

CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO EM FRIGORÍFICO

por

Claudia Walus Stocco

Esta dissertação foi apresentada às 14h00min de 23 de fevereiro de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, com área de concentração em Gestão Industrial, linha de pesquisa em Gestão Industrial, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo citados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Renata Dinnies Santos Salem
(UEPG)

Prof. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
(UTFPR)

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

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

Prof. Dr. Antonio Carlos de Francisco
(UTFPR)
Coordenador do PPGEP

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

Dedico esta dissertação à minha família e
ao meu marido Bruno, pelos momentos
de ausência e pelo apoio nos dias difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas em todos os momentos.

Aos meus pais, Angelo e Valdirene pelo amor e apoio incondicional.

A minha irmã, Sthefany pela ajuda quando precisei.

Ao meu marido Bruno, por estar ao meu lado todos os dias, sempre apoiando nos momentos difíceis e pelo incentivo na vida acadêmica.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt, pela sabedoria com que me guiou nesta trajetória e pelos ensinamentos adquiridos.

As minhas amigas de laboratório, Luciana de Almeida, Mariely Santos, que sempre me ajudaram e escutaram minhas reclamações, como também participando de minhas conquistas.

A Mariana Fidelis, pela contribuição científica na realização do trabalho.

A Secretaria do Curso, pela cooperação.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

Creio que a pessoa que teve mais experiência de privações consegue enfrentar problemas com mais firmeza que a pessoa que nunca passou por sofrimento. Portanto, visto por esse ângulo, um pouco de sofrimento pode ser uma boa lição para a vida (Dalai Lama).

RESUMO

STOCCO, Cláudia Walus. **Controle de qualidade microbiológico em frigorífico.** 2017. 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2017.

Uma superfície mal higienizada em um ambiente produtivo, somada à capacidade de adesão de um microrganismo, pode se tornar uma fonte potencial de contaminação e levar à formação de biofilmes. Estes, uma vez formados, são de difícil remoção e podem proliferar para a contaminação de alimentos. A preocupação com a segurança dos alimentos é um desafio, visto que problemas a ela relacionados podem comprometer a saúde do consumidor. O objetivo deste trabalho foi isolar microrganismos patogênicos potenciais produtores de biofilme microbiano presentes no processamento industrial de um frigorífico bovino. O desenvolvimento do trabalho se resume em três fases: entrevista com o coordenador de qualidade de um frigorífico da região dos Campos Gerais; diagnóstico de pontos críticos no controle de qualidade do processamento industrial desse frigorífico, por meio de um diagrama decisório e coleta de amostras durante o processo industrial através de swabs, utilizados no isolamento por microbiologia. Em seguida, foi identificado o perfil genético das amostras, por meio do isolamento de DNA, seguida de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase com os primers universais rD1 e fD1. Os dados gerados na primeira fase indicam os programas de controle de qualidade aplicados na indústria frigorífica em estudo. A entrevistada, responsável pelo controle de qualidade da indústria, salientou o uso de Boas Práticas de Fabricação (BPF), Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Monitoramento de Pragas (MIP) e Folha de Verificação (FV). A partir do diagrama decisório, foram identificados 25 pontos para a coleta de amostras para a identificação de microrganismos patogênicos. Dentre esses, dez pontos amostrais foram isolados por microbiologia convencional com meio de cultura EMB, indicando contaminação de conteúdo gastrointestinal por coliformes fecais. Em dez pontos, nem sempre distintos, houve crescimento em meio de cultura SS – *Salmonella Shigella*, indicando contaminação durante o abate a partir da manipulação da carne pelos funcionários, uma vez que esses podem ser portadores sadios de microrganismos patogênicos. Para identificação genotípica das amostras sequenciadas, os resultados chegaram a nível de gênero, sendo *Escherichia*, *Proteus*, *Hafnia* e *Bacillus*, todos pertencentes ao grupo de Enterobactérias, com exceção de *Bacillus*. Verificou-se através da identificação genotípica, relacionada com os locais de coleta das amostras no fluxograma, que há contaminação cruzada no ambiente produtivo do presente frigorífico, na maioria dos pontos, relacionadas com o manipulador.

Palavras-chave: Microrganismos Patogênicos. Enterobactérias. Biofilmes Microbianos. Indústria de Carne. Identificação Genotípica.

ABSTRACT

STOCCO, Cláudia Walus. **Microbiological quality control in a fridge**. 2017. 86 p. Dissertation (Master Degree in Production Engineering) – Federal Technology University - Paraná. Ponta Grossa, 2017.

An unhygienic surface in a productive environment, added to the adhesion capacity of a microorganism, can become a potential source of contamination and lead to the formation of biofilms. These, once formed, are difficult to remove and can proliferate for food contamination. Concern about food safety is a challenge, as related problems can compromise consumer health. The objective of this work is to select potential pathogenic microorganisms producing microbial biofilms present in the industrial processing of a beef cattle. The development of the work is summarized in three phases: interview with the quality coordinator of a refrigerator in the Campos Gerais region; diagnosis of critical points in the quality control of the industrial processing of this refrigerator, through a decision diagram and sample collection during the industrial process through swabs, used in the isolation by microbiology. Then, the genetic profile of the samples was identified through DNA isolation, followed by amplification by Polymerase Chain Reaction with the universal primers rD1 and fD1. The data generated in the first phase indicated the quality control programs in the refrigeration industry under study. The interviewee, responsible for the quality control of the industry, emphasized the use of Good Manufacturing Practices (GMP), Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP), Standard Operating Procedures (PPHO), Pest Monitoring (IPM) And Verification Sheet (FV). From the decision diagram, 25 points were identified for the collection of samples for the identification of pathogenic microorganisms. Among these, ten sample points were isolated by conventional microbiology with EMB culture, indicating contamination of gastrointestinal contents by fecal coliforms. At ten points, not always distinct, there was growth in the SS - *Salmonella Shigella* culture, indicating contamination during slaughter from the handling of the meat by the employees, since they may be healthy carriers of pathogenic microorganisms. For genotypic identification of the sequenced samples, the results reached the species level, being *Escherichia*, *Proteus*, *Hafnia* and *Bacillus*, all belonging to the group of Enterobacteria, except for *Bacillus*. It was verified through the genotypic identification, related to the sample collection sites in the flowchart, that there is cross contamination in the productive environment of the present refrigerator, in most of the points, related to the manipulator.

Keywords: Pathogenic Microorganisms. Microbial Biofilms. The Meat Industry. Genetic Profile.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenvolvimento de biofilmes bacterianos.....	27
Figura 2 – Diagrama Decisório para Determinações de Pontos Críticos de Coleta.....	33
Figura 3 – Fluxograma dos pontos de coleta de amostras no processo produtivo.....	42
Figura 4 – Amostras de DNA extraídas por método CTAB visualizadas por eletroforese em gel de agarose	53
Figura 5 – Produtos de PCR em gradiente de temperatura visualizadas em gel de agarose 1,8%.....	54
Figura 6 – Produtos da PCR visualizados em gel de agarose 1,8%, enviados para sequenciamento.....	55
Figura 7 – Árvore filogenética construída com os pontos 11,13 e 15 com crescimento positivo em meio EMB e com resultado de sequenciamento para <i>E. coli</i>	57
Figura 8 – Pontos amostrais com contaminação por <i>Escherichia coli</i> confirmada por sequenciamento.....	59
Figura 9 – Pontos amostrais com contaminação por <i>Hafnia alvei</i> confirmada por sequenciamento.....	60
Figura 10 – Contaminação cruzada de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Proteus vulgaris</i> relacionado com os pontos amostrais.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Microrganismos indicadores de higiene com descrição de ocorrência e problemas causados.....	24
Quadro 2 – Resultado do crescimento positivo ou negativo de amostras isoladas nos meios EMB, SS e MSA a partir de 25 pontos em um processamento frigorífico.....	44
Quadro 3 – Resultados do sequenciamento do produto da PCR.....	56

LISTA DE SIGLAS

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

BPF – Boas Práticas de Fabricação

CEP – Controle Estatístico de Processo

CIP – *Cleaning In Place*; em português, limpeza no local

CTAB - Cetyl Trimethylammonium Bromide

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*; em português, ácido desoxirribonucleico

DTA'S – Doenças Transmitidas por Alimentos

EDTA - *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*; em português, Ácido etilenodiamino tetracético

FDA – *Food and Drug Administration*; em português, Administração de Alimentos e Remédios

FV – Folha de Verificação

ISO - *International Organization for Standardization*; em português, Organização Internacional para Padronização

MIP – Monitoramento de Pragas

PCC – Ponto Crítico de Controle

PCR - *Polymerase Chain Reaction*; em português, Reação em Cadeia da Polimerase

POP – Programa Operacional Padrão

PPHO – Programa Padrão de Higiene Operacional

PVP – *Polyvinylpyrrolidone*

RNA – *Ribonucleic Acid*; em português, Ácido Ribonucleico

TBE – Tris Borato EDTA

TC – Tampão de Carregamento

TE – Tampão de Extração

UFC – Unidade Formadora de Colônia

WHO – *World Health Organization*; em português, Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL	14
1.1.1 Objetivos Específicos	14
1.2 JUSTIFICATIVA.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 CONTROLE DA QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE CÁRNEOS.....	16
2.2 PROGRAMAS DE QUALIDADE	17
2.2.1 Boas Práticas de Fabricação – BPF.....	18
2.2.2 Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC.....	18
2.2.3 Procedimentos Operacionais Padrão – POP’s.....	19
2.2.4 Programa Padrão de Higiene Operacional – PPHO.....	20
2.2.5 ISO 22000:2006	20
2.3 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS FORMADORES DE BIOFILMES.....	21
2.3.1 Microrganismos Indicadores de Higiene.....	21
2.3.2 Biofilmes.....	24
2.3.2.1 Formação do biofilme	26
2.4 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS	29
2.4.1 Uso de PCR para Identificação de Microrganismos	29
3 METODOLOGIA.....	32
3.1 PROPOSTA METODOLÓGICA	32
3.2 LOCAL DA PESQUISA E COLETA DAS AMOSTRAS	32
3.3 LEVANTAMENTO DO CONTROLE DA QUALIDADE	34
3.4 ISOLAMENTO POR MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL.....	34
3.4.1 Isolamento por Meio de Cultura EMB - Eosin Methylene Blue.....	35
3.4.2 Isolamento por Meio de Cultura SS – <i>Salmonella Shigella</i>	35
3.5 PERFIL MOLECULAR DOS ISOLADOS NO PROCESSO PRODUTIVO.....	36
3.5.1 Isolamento de DNA	36
3.5.2. Reação Para Amplificação - PCR	37
3.5.3 Sequenciamento do produto da PCR.....	37
3.5.4 Purificação das amostras para sequenciamento.....	38
3.5.5 Identificação Genotípica	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PRODUTOS CÁRNEOS ..	40

4.2 DETERMINAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA	42
4.3 ANÁLISE DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NO PROCESSO PRODUTIVO	43
4.3.1 Origem de Enterobactérias no Processo Produtivo.....	46
4.3.2 Origem de Estafilococos no Processo Produtivo.....	51
4.4 VERIFICAÇÃO DA IDENTIDADE DOS PATÓGENOS ISOLADOS DO PROCESSO PRODUTIVO.....	52
4.4.1 Isolamento de DNA	52
4.4.2 Ajustes para a Amplificação Com Iniciadores Universais (rD1 e fD1)	53
4.4.3 Sequenciamento dos Produtos da PCR	54
4.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA	55
4.5 APLICAÇÕES PARA CONTROLE DE QUALIDADE NO PROCESSO PRODUTIVO	57
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A - Questionário de pesquisa realizado com a coordenadora da qualidade do frigorífico bovino em estudo para levantamento dos programas de controle de qualidade utilizados.	79

1 INTRODUÇÃO

A contaminação por microrganismos patógenos nas indústrias de carnes é considerada um grande problema de segurança alimentar, pois uma vez presente na linha de processamento, o microrganismo é dificilmente eliminado, em função de sua capacidade em formar biofilme.

Atualmente, existem aproximadamente 250 tipos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's), sendo a maioria delas causada por microrganismos patogênicos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as DTA's são causadas por agentes que infectam o hospedeiro, através da ingestão de alimentos e/ou água contaminados; alimentos contaminados por pequenas quantidades de determinados microrganismos que podem não causar surtos alimentares

Estas ocorrem devido aos microrganismos patogênicos pertencerem à microbiota natural dos animais de corte, encontrados no trato digestório, faringe, narinas, tecido linfático, com posterior contaminação das carcaças durante o processo do abate (MATSUBARA, 2005).

Uma superfície mal higienizada em um ambiente produtivo, somada à capacidade de adesão de um microrganismo, pode se tornar uma fonte potencial de contaminação e levar à formação de biofilmes. Estes, uma vez formados, são de difícil remoção e podem contaminar alimentos. Portanto, a formação de biofilmes conduz a sérios problemas de higiene e perdas econômicas devido a deterioração dos alimentos e persistência de patógenos, reduzindo assim, o prazo de validade dos produtos desde o processamento até a comercialização (VALCARCE et al., 2002).

Processos de higienização deficientes ou inexistentes podem levar a formação de biofilmes por microrganismos sobre superfícies. A natureza dos biofilmes dificultam a limpeza e a sanitização, sendo que o desenvolvimento do biofilme depende das características do microrganismo, do material de aderência, do substrato presente, do pH, da temperatura do meio, entre outros fatores. Durante a formação há o acúmulo de células viáveis na superfície de aderência onde ocorre a adesão inicial do microrganismo, que em seguida, permanece sob uma matriz de exopolissacarídeos.

Espera-se com este trabalho realizar o diagnóstico de pontos críticos no controle de qualidade, propondo a aplicação de método de diagnóstico molecular para a identificação dos microrganismos patogênicos presentes no processamento industrial de carne bovina.

O seguinte trabalho insere-se em engenharia de produção na área de engenharia da qualidade, com subárea na confiabilidade de processos e produtos, sendo o foco principal garantir a qualidade no processamento.

Para tanto, tem-se a seguinte pergunta de pesquisa: Quais são e de onde são provenientes os microrganismos envolvidos na formação de biofilmes em superfícies e equipamentos industriais presentes em um frigorífico bovino?

1.1 OBJETIVO GERAL

Isolar microrganismos patogênicos presentes no processamento industrial de carne bovina.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Determinar os pontos amostrais para coleta no processamento industrial de um frigorífico bovino.
- Isolar microrganismos indicadores de higiene.
- Determinar o perfil genético dos microrganismos isolados por microbiologia por meio de sequenciamento.

1.2 JUSTIFICATIVA

A carne bovina é composta por proteínas, gorduras, carboidratos, sais minerais e água. Em função de sua riqueza em nutrientes, demonstra-se um ótimo meio de cultura para o crescimento de vários microrganismos, apresentando fatores naturalmente favoráveis como composição química, alta atividade de água e pH próximo à neutralidade. Fatores exógenos como umidade e temperatura ambiente alteram a microbiota natural de produtos cárneos, contribuindo para o

desenvolvimento de microrganismos patógenos e deteriorantes (FRANCO, LANDGRAF, 2010; JAY, 2005; FERREIRA, 2008).

O presente trabalho justifica-se pela presença de inúmeros microrganismos patógenos no ambiente industrial de um frigorífico, sendo que a maior parte desses produz biofilme, o que dificulta a limpeza eficaz dos equipamentos e utensílios favorecendo a contaminação cruzada. Os biofilmes são altamente resistentes a desinfetantes, representando um desafio para as indústrias alimentares (OUYANG et al. 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONTROLE DA QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE CÁRNEOS

O crescimento da demanda mundial por produtos cárneos pode preocupar os consumidores com uma alimentação saudável, voltando-se ao aspecto de alimentação segura. Esses produtos têm maior demanda, quando acresce as exigências do consumidor, favoráveis à compra e ao consumo de produtos seguros (BUENO et al., 2007). Sendo assim, é indispensável oferecer maior atenção à gestão da qualidade em frigoríficos, associando com a segurança alimentar, com os padrões microbiológicos, à sanidade e a ausência de substâncias nocivas (TOLEDO, 2001).

A preocupação com a segurança dos alimentos é um desafio em função de problemas que podem comprometer a saúde do consumidor. A segurança dos alimentos está relacionada com a presença de perigos físicos, químicos e biológicos, com níveis cabíveis no alimento, sem causar um efeito adverso a saúde humana (DIAS et al., 2010; PERETTI; ARAUJO et al., 2010).

Pesquisas realizadas constatarem que diversas superfícies encontradas nas indústrias de alimentos, como aço inoxidável, vidro, borracha, fórmica, polipropileno e o ferro forjado são passíveis de apresentar a formação de biofilmes. Estes também são formados nas superfícies de alimentos, como frutas, vegetais, carcaças de animais e peixes (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

O desprendimento de células bacterianas oriundas dos biofilmes é um fator para a disseminação e colonização em outros locais (LAZZAROTTO, 2010). O aço inoxidável é o principal material de contato usado pelas indústrias de alimentos, porque é estável em uma variedade de temperaturas de processamento, além de ser fácil de higienizar e ter alta resistência à corrosão (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Porém, é comumente associado à contaminação microbiana devido a adesão e formação de biofilmes em sua superfície (HILBERT et al., 2003).

As falhas nos procedimentos de higienização podem originar contaminações por microrganismos patogênicos e/ou alteradores, substâncias químicas, agentes físicos, além da contaminação cruzada (ROCHA et al., 1999).

Segundo Dutra (2006), os alimentos dentro de um processamento industrial podem ser contaminados por microrganismos patogênicos e deteriorantes, resultado de condições de higiene insatisfatória durante o processamento. Essa contaminação pode ser de pessoas doentes ou conteúdos gastrointestinais dos animais abatidos, e devido às más práticas de fabricação.

A limpeza inclui as etapas de pré-lavagem com água, para remoção das sujidades, seguida do uso de agentes químicos, detergentes alcalinos e/ou ácidos, para remoção de resíduos orgânicos e minerais das superfícies, e do enxágue antes da sanificação (ANDRADE; MACÊDO, 1996; GIESE, 1991). A sanificação visa eliminar microrganismos patogênicos e reduzir alteradores das superfícies de equipamentos, utensílios, manipuladores e dos ambientes até níveis considerados seguros, podendo ser realizada tanto por sanificantes físicos, como o calor, na forma de vapor, água ou ar quente, e a radiação, particularmente a radiação ultravioleta, quanto por sanificantes químicos, como os compostos clorados, iodóforos, composto quaternário de amônia, ácido peracético, entre outros (ANDRADE; MACÊDO, 1996; ROCHA et al., 1999).

Quando células viáveis dos microrganismos estão sob o biofilme, são de dez a mil vezes mais resistentes aos efeitos das substâncias antimicrobianas químicas, como os desinfetantes utilizados por indústrias de processamento de alimentos (BERESFORD et al., 2001; MAH; O'TOOLE, 2001; CABEÇA, 2006).

2.2 PROGRAMAS DE QUALIDADE

As ferramentas empregadas na gestão da qualidade como 10S, e de garantia da qualidade (BPF, PPHO), são obrigatórias como pré-requisitos para o sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e, a norma ISO 9000, consiste em uma ferramenta de controle de processos e gestão da qualidade, necessitando do sistema APPCC como complemento para a segurança sanitária (RIBEIRO-FURTINI; ABREU, 2006).

2.2.1 Boas Práticas de Fabricação – BPF

As Boas Práticas de Fabricação (BPF) compreendem um conjunto de medidas que devem ser seguidas pelas indústrias de alimentos, visando garantir a qualidade sanitária e a conformidade dos produtos alimentícios com as regras legais e com os regulamentos técnicos (BRASIL, 2001).

A implantação das Boas Práticas de Controle foi regulamentada no Brasil pela Portaria nº 1428 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1993). As normas para a correta implantação das Boas Práticas de Controle envolvem requisitos básicos, desde as instalações da indústria até severas regras de higiene pessoal e limpeza do local de trabalho, tais como lavagem correta e repetida das mãos, utilização dos uniformes adequados para cada função e descrição, dos procedimentos envolvidos no processamento do produto (QUEIROZ et al., 2000).

As BPF são condições primárias para o funcionamento de um estabelecimento de alimentos. Dentre as ferramentas utilizadas para o diagnóstico das BPF está a aplicabilidade de um *check-list*, que permite elencar as conformidades e não-conformidades dos estabelecimentos, permitindo uma análise de cada departamento ou área. Isso contribui no planejamento de ações para corrigir os erros, tais como adequação das instalações e procedimentos no processo produtivo e eliminação dos perigos que possam comprometer a saúde do consumidor (MUJICA, 2006).

2.2.2 Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC

Hazard Analysis and Critical Control Points, é um sistema preventivo que visa a produção de alimentos seguros, com princípios técnicos e científicos, aplicado em todas as fases da produção de alimentos até o consumidor final (GIORDANO; GALHARDI, 2007; BERTOLINO, 2010).

Esse sistema é recomendado desde a década de 70 pela *Food and Drug Administration* – FDA, sendo indicado por *World Health Organization* – WHO e *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* – ICMSF. Em seguida, foi preconizado pelo *Codex Alimentarius*, tornando-se referência mundial no controle de qualidade e segurança alimentar (BERTOLINO, 2010).

Com base no sistema de prevenção, o APPCC especifica os tipos de risco ou perigos à segurança alimentar, de forma natural ou decorrentes dos erros de processamento. Os perigos químicos são os mais temidos pelos consumidores; os físicos, mais identificados e os biológicos, mais graves perante a saúde pública, sendo tratados com maior importância (RIBEIRO-FURTINI; ABREU, 2006).

A implantação do sistema APPCC acontece em várias etapas e os procedimentos iniciais são indispensáveis, sendo necessário o comprometimento da alta gerência da empresa e a designação de um profissional treinado para a coordenação da implantação (RIBEIRO-FURTINI; ABREU, 2006). Segundo o *Codex Alimentarius* (2009), o sistema APPCC deve ser implantado em doze etapas: a formação da equipe para a implantação do sistema, a descrição do produto, a identificação do uso correto do produto, a elaboração de um fluxograma para resumir o processo, a confirmação do fluxograma da etapa anterior, a análise dos perigos e medidas preventivas, a determinação dos pontos críticos de controle, o estabelecimento de limites críticos para cada ponto crítico de controle, o monitoramento de cada ponto crítico de controle, as ações corretivas necessárias para o produto, os procedimentos para verificar se o sistema está adequado, por fim, um sistema de documentação e registro das etapas anteriores.

2.2.3 Procedimentos Operacionais Padrão – POP's

De acordo com BRASIL (2001), é definido como procedimento descrito de forma a definir as instruções para a realização de uma atividade no processamento de alimentos, evitando a contaminação direta ou cruzada com a posterior alteração do produto, para preservar a sua qualidade e integridade. Este programa garante melhorias na condução de tarefas realizadas diariamente, processos adequados, treinamento dos colaboradores e rastreabilidade dos processos. Portanto, o Procedimento Operacional Padrão é a base para a padronização de tarefas rotineiras da empresa, garantindo aos consumidores um produto livre de variações na qualidade final (TERRA et al., 2010).

Este procedimento visa padronizar e minimizar as ocorrências de desvios de tarefas no processamento dos alimentos, garantindo ao usuário que todas as decisões tomadas sejam as mesmas rotineiramente, aumentando a previsibilidade

dos resultados e diminuindo as variações por adaptações realizadas (TERRA et al., 2010).

2.2.4 Programa Padrão de Higiene Operacional – PPHO

O objetivo do Programa Padrão de Higiene Operacional é prevenir a contaminação direta de produtos, com destaque às fontes de contaminação secundária ou cruzada de produtos com água não potável, evitar o contato com substâncias não alimentares, prevenir enfermidades dos manipuladores, fiscalizar higiene imprópria do estabelecimento e identificar objetos estranhos nos alimentos (FIGUEIREDO, 1999).

Existem duas exigências para o PPHO, sendo a necessidade de um manual para cada planta de processamento e o monitoramento do PPHO por meio das condições práticas durante o processamento, para assegurar a conformidade com as condições especificadas nos manuais de Boas Práticas de Fabricação (FIGUEIREDO, 1999).

2.2.5 ISO 22000:2006

A ISO 9001 foi revisada e alinhada com a ISO 22000 para aumentar a compatibilidade entre eles. Respectivamente, apresentam normas referente a qualidade da gestão e segurança de alimentos. O alinhamento prova a relação direta entre segurança alimentar e gestão de qualidade. Não é válido para uma empresa criar um setor exclusivamente dedicado a segurança alimentar, ela deverá ser empregada em todos os setores, e é encontra desde a escolha ideal dos fornecedores de matéria-prima. A conciliação dessas normas coincide com uma organização que utilize sistemas de gestão integrados (ABNT, 2006).

A ISO 22000 apresenta características e abordagens diferentes do ISO 9001, pois, ela interfere na segurança alimentar e cadeia produtiva. Esta Norma especifica as qualidades necessárias no sistema de gestão de segurança de alimentos, para que haja controle total da qualidade na cadeia produtiva, garantindo que o produto seja consumido e preparado de forma segura. Como requisitos gerais da Norma, a

organização deve garantir que nenhuma conformidade altere a qualidade esperada do produto final e cause dano direto ou indireto ao consumidor (ABNT, 2006).

Todas as ferramentas de controle de qualidade tentam minimizar a presença de microrganismos patógenos nos alimentos. Estas ferramentas são as principais intervenções ao combate da formação de biofilmes em ambientes industriais.

2.3 MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS FORMADORES DE BIOFILMES

Carcças e produtos cárneos são substratos para o crescimento e multiplicação de microrganismos produtores de biofilmes. Sendo esgotados os carboidratos da carne, há o consumo de fonte proteica, que é a principal composição deste tipo de produto. A pesquisa de microrganismos patogênicos, conforme Bhunia (2007) é dividida em pesquisa direta e indireta através de indicadores de higiene, revelando a presença de patógenos. Os principais microrganismos estudados no processo de controle de qualidade são aeróbios mesófilos, coliformes e enterobactérias.

2.3.1 Microrganismos Indicadores de Higiene

Inúmeros microrganismos são capazes de aderir a uma superfície e formar biofilmes, sendo divididos em deteriorantes e patogênicos (NITSCHKE, 2006). Sendo capazes de participar com maior ou menor intensidade desses processos de adesão.

Entre os alteradores estão *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus spp.*, e em relação aos patogênicos, incluem-se *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157: H7 e *B. cereus* (ANDRADE; MACÊDO, 1996).

Enterobactérias

A fonte de enterobactérias frequentemente está associada com a manipulação da carne e superfícies de trabalho. Microrganismos deteriorantes da família *Enterobacteriaceae* podem multiplicar-se em proporções significativas na

carne embalada a vácuo ou em atmosfera modificada quando estocada em temperaturas maiores que 10° C (PENNEY et al., 1993). A presença de enterobactérias é um indicador para possível contaminação fecal decorrente de inadequado processamento ou contaminação pós-processamento (TORNADIJO et al., 2001). As enterobactérias compreendem um grupo de microrganismos oriundos de contaminação fecal, por serem localizadas no intestino e no conteúdo gastrointestinal.

Certas espécies de enterobactérias psicrófilas ocorrem na carne refrigerada. São capazes de se multiplicar aerobicamente no tecido adiposo e tecido muscular com pH maior que 6,0. Seu desenvolvimento é favorecido em temperaturas maiores ou iguais a 4° C. Os principais gêneros da família *Enterobacteriaceae* apontados como deteriorantes de carne e produtos cárneos são *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Providência*, *Serratia*, *Escherichia* e *Yersinia* (BRENNER, 1992)

Escherichia coli

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbica facultativa, gram negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, originária da flora intestinal, forma de bacilo, medindo aproximadamente 0,5 µm de largura e 2 µm de comprimento (TORTORA, FUNKE, 2005). Microrganismo habitante do trato intestinal de humanos e animais endotérmicos, mas, se direcionado para a circulação sanguínea, pode ser capaz de provocar doenças e infecções no organismo hospedeiro. Além disso, podem ser contraídas cepas da bactéria pela ingestão de água ou alimentos contaminados, pelo contato com animais doentes e instrumentos médicos contaminados, podendo causar graves infecções no trato urinário, sendo uma das infecções mais contraídas por seres humanos (BOLAND et al., 2000).

As formas de infecções causadas por *E. coli* irão depender da cepa e de sua patogenicidade, idade e o estado imunológico do infectado. As toxinas excretadas por este microrganismo são de grande importância para a saúde pública, pois está associada a casos de septicemia, diarreias e meningite nos humanos (FORSYTHE, 2005).

Salmonella spp.

A *Salmonella spp.* é um dos patógenos com maior envolvimento com doenças de origem alimentar (WHO, 2002). Conforme descrito por Franco e Landgraf (2010), este microrganismo possui pH ótimo em torno de 7,0, temperatura ideal entre 35 e 37 °C, tolerância de sal superior a 9 %,.

Esse microrganismo causa doenças através da ingestão de alimentos contaminados, atravessando a camada epitelial intestinal, onde se proliferam, resultando em inflamação decorrente da atividade do sistema reticuloendotelial (HAIMOVICH; VENKATESA, 2006).

Inúmeros alimentos podem ser contaminados com *Salmonella spp.*, principalmente os com alto teor de umidade, proteína e carboidratos, destacando-se a carne bovina, suína, aves, ovos, leite e derivados e frutos do mar, são os alimentos mais suscetíveis a deterioração (SURESH; HATHA; SCREENIVASA, 2006).

As doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados por este microrganismo patógeno se dividem em três grupos, sendo febre tifoide causada pela *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi* são causadoras das febres entéricas e as salmoneloses são causadas pelas demais salmonelas (FRANCO; LANDGRAF, 2010).

A transmissão da *Salmonella spp.* para o ser humano ocorre principalmente pelo consumo de alimentos, mas pode ocorrer em hospitais ou contato com animais infectados (WELLS; FEDORKA-CRAY; DARGARTZ, 2001).

Entre outros microrganismos que são indicadores de higiene são: *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Hafnia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, a ocorrência no ambiente e seus problemas e doenças causadas estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Microrganismos indicadores de higiene com descrição de ocorrência e problemas causados

Microrganismo	Ocorrência	Problemas causados
<i>Citrobacter spp</i>	Fezes de humanos e animais, isolado de amostras clínicas como patógenos oportunistas.	<i>Citrobacter diversus</i> pode causar meningite neonatal. Também encontrado no solo, água, esgoto e alimentos.
<i>Enterobacter spp.</i>	São espécies distribuídas na natureza, advindas de água doce, solo, esgoto, plantas, vegetais, animais e fezes de seres humanos.	<i>E. cloacae</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. agglomerans</i> e <i>E. gergoviae</i> são patógenos oportunistas de queimaduras e feridas, causam também infecções do trato urinário e ocasionalmente septicemias e meningite.
<i>Hafnia spp.</i>	Fezes de humanos e animais incluindo pássaros, água de esgoto, solo, água e produtos de origem animal.	São patógenos oportunistas para o homem, usualmente no sangue, urina ou feridas infeccionadas em pacientes com estado de saúde debilitado ou imunodeprimidos.
<i>Klebsiella spp.</i>	Fezes de seres humanos e espécimes clínicas, solo, água, grãos, frutas e vegetais.	São patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, pneumonia, infecções do trato urinário e outras infecções ao homem.
<i>Proteus spp.</i>	Intestino dos seres humanos e em um grande número de animais, solo e águas poluídas.	Patógenos de humanos causam infecções no trato urinário, invasões secundárias e lesões septicêmicas.
<i>Providencia spp.</i>	Isolados de casos de diarreias em seres humanos, infecções do trato urinário, feridas e queimaduras.	São patogênicos para os seres humanos.

Fonte: Adaptado de Farmer (2003); Holt et al. (1994); Janda, Abbott (2006).

2.3.2 Biofilmes

Os biofilmes microbianos podem ser constituídos de bactérias aderidas às superfícies, envolvidas por uma camada de partículas de matéria orgânica, sendo depósitos nos quais microrganismos que estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza polissacarídica, denominados glicocálix (CRIADO et al., 1994).

A matriz de exopolissacarídeos age como adesivo e barreira defensiva, protegendo as células de agentes antimicrobianos, evitando seu destacamento pelo fluxo destas substâncias (KIVES et al., 2006). São considerados agentes antimicrobianos substâncias com zonas ativas para estabelecer interações com componentes celulares em sítios alvos específicos de cada célula microbiana (PAULUS, 1993). Entre os agentes antimicrobianos, tem-se os de caráter oxidantes e os não oxidantes, como exemplo, compostos clorados, compostos não halogenados, aldeídos, sais quaternários de amônio, entre outros (ANDRADE, 2008).

A composição da matriz extracelular varia entre os microrganismos de acordo com diversas condições ambientais. O exopolissacarídeo é avaliado como componente essencial da matriz, relacionado à adesão inicial das células microbianas à superfície (LASA; PENADÉS, 2006).

Grande parte da matriz extracelular, aproximadamente 97%, é constituída por água, sendo parte da composição das células ou livre no meio em torno delas, atuando como solvente. Além de água e células microbianas, o biofilme é formado por substâncias poliméricas extracelulares, constituídos de proteínas, lipídeos, fosfolipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas, formando a proteção contra agressões químicas e físicas (PARIZZI et al., 2004; SUTHERLAND, 2001). Nos biofilmes, as células microbianas representam menos de 10% de matéria seca, e a matriz de exopolissacarídeos é responsável por mais de 90% (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Algumas matrizes extracelulares são produzidas pelas células microbianas durante todo o crescimento do microrganismo, enquanto outras são sintetizadas durante a fase estacionária. A síntese do biofilme ocorre intracelularmente, alterada pela restrição de nutrientes essenciais (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

As primeiras observações de biofilmes foram feitas por Antonie van Leeuwenhoek, que analisou em seu microscópio amostras de dente, notando mais fragmentos de células agregadas. A primeira descrição de aderência microbiana em superfícies foi estudada por Zobell nos anos 40 (PIZZOLITTO et al., 2001; COSTERTON; WILSON, 2004).

A adesão pode constituir-se de microrganismos patogênicos, que resultam em sérios problemas de higiene, de saúde pública ou de ordem econômica

(CRIADO et al., 1994). Branda et al. (2005), reconheceram a capacidade de bactérias em formar celulose extracelular, entre eles *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* e *Gluconacetobacter xylinus*.

No processamento industrial, os biofilmes são avaliados como um problema nas áreas de processamento de produtos frescos e lácteos, além do processamento de aves e carnes vermelhas (CHEN; ROSSMAN; PAWAR, 2007). Os biofilmes são responsáveis por aproximadamente 60% das infecções bacterianas humanas. Assim, o desenvolvimento de biofilmes possui efeitos importantes no processamento industrial, e principalmente na saúde humana (COSTERTON, 1999; PHILLIPS et al, 2010).

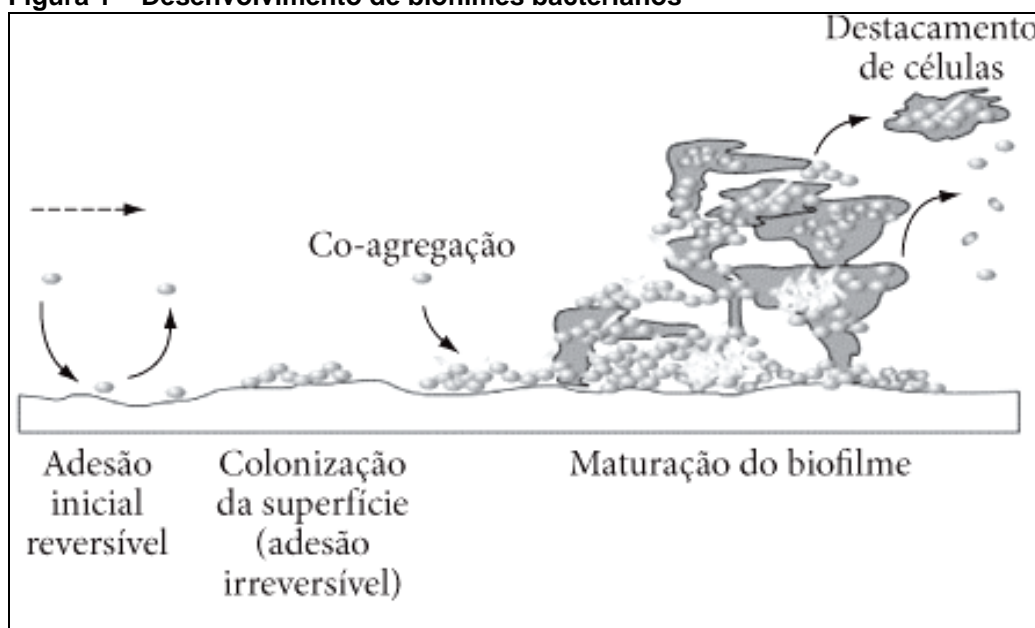
O desenvolvimento de biofilmes pode afetar negativamente várias atividades, como estragos em equipamentos devido a biocorrosão, contaminação de produtos alimentícios, perda de pressão em tubulações, causando prejuízos para a indústria (PIZZOLITTO et al., 2001). Na indústria de alimentos, como um fator positivo, os biofilmes são utilizados para a produção de fermentados, como vinagre, ácido acético e shoyu (XAVIER et al., 2002).

2.3.2.1 Formação do biofilme

Para se considerar que as células viáveis de um microrganismo aderidos em uma superfície constituam um biofilme, Andrade e Macedo (1996) definem que o número mínimo seja de 10^7 células aderidas por cm^2 . Para Wirtanen et al. (1996), é considerado um biofilme quando o número de células aderidas é de 10^3 por cm^2 .

Uma das primeiras teorias de formação de biofilmes foi descrita por Marshall et al. (1971), expondo que a formação ocorre em duas fases, sendo a primeira reversível, por razão da adesão do microrganismo na superfície pela força de Van der Waals, atração eletrostáticas e interações hidrofóbicas. A segunda etapa ocorre por interações dipolo-dipolo, ligações iônicas, pontes de hidrogênio, interação da célula com a superfície, com a produção de exopolissacarídeos produzido pelo microrganismo, chamada matriz de glicocálix. Na segunda fase, as fímbrias da matriz se prendem à célula microbiana e ao substrato do meio, tornando assim, a dificuldade de remoção do biofilme formado, como demonstrado na Figura 1.

Figura 1 – Desenvolvimento de biofilmes bacterianos



Fonte: JENKINSON; LAPPIN-SCOTT (2001)

Denne Júnior (2002) e Mittelman (1998) descrevem que a adesão bacteriana e a formação do biofilme ocorrem em três etapas. A primeira etapa consiste na cobertura da superfície com filmes de condicionamento orgânico, que podem ser de componentes proteicos do sangue, condição encontrada em frigoríficos, por exemplo. Na segunda etapa de adesão, as células são carregadas para a superfície entre a parede celular e o substrato. A terceira etapa consiste no condicionamento orgânico, na qual os microrganismos ligam-se ao exopolissacarídeo formado, denominado maturação.

Adesão do biofilme

A adesão microbiana e a formação de biofilmes ocorrem devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato, na qual se fixam e iniciam o crescimento (ZOTTOLA, 1994; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994).

Diversos fatores influenciam a adesão microbiana às superfícies, dentre os quais incluem-se as características do microrganismo, como espécie, carga, hidrofobicidade, concentração, presença de apêndices superficiais, como pili, fimbrias, flagelo, cápsula; a síntese de substâncias exopoliméricas; as características do material aderente, como carga e microtopografia; e as

características do meio que envolve o microrganismo, tais como pH, temperatura, tempo de contato, agitação (TROLLER, 1993; ZOTTOLA; SASAHARA, 1994; BOWER et al., 1996).

A adesão de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* em superfícies e culturas em diferentes pHs, entre 6 e 8, foi estudada por Mafu et al. (2010). Os patógenos podem ser adaptar aos diferentes pH dos meios de cultura, aderindo-se independente da superfície.

Maturação do biofilme

A maturação do biofilme corresponde à continuação do desenvolvimento das células dos microrganismos, com a posterior divisão e agregação das células, com disponibilidade de nutrientes do meio circundante, juntamente com a excreção de exopolissacarídeos, formando a estrutura do biofilme. Várias células alteram seus processos fisiológicos perante as condições em que se encontram (XAVIER, 2002; STOODLEY, 2002).

Nesta etapa, ocorre também a fixação das células da bactéria, havendo a acumulação de micro colônias. O biofilme com alta densidade de células microbianas apresenta uma arquitetura complexa, incluindo canais e poros, com redistribuição das células em locais distantes do substrato. Com o aumento da espessura desse biofilme, é fornecida estabilidade às comunidades microbianas contra flutuação no ambiente (XAVIER, 2002; BEHLAU, GILMORE, 2010; FORSYTHE, 2005).

Ruptura do biofilme

A ruptura do biofilme consiste na etapa da liberação do material celular, com a erosão ou perda das células individuais, seguida da descamação ou perda de células agregadas. Logo após a etapa de maturação, os níveis de exopolissacarídeos da matriz tendem a diminuir, devido ao metabolismo, liberando células individuais ou agregadas de um biofilme, ou com relação ao aumento da concentração de moléculas que liberam enzimas degradantes da matriz polimérica (STOODLEY, 2002; BEHLAU, GILMORE, 2010).

2.4 IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

A determinação da comunidade bacteriana é de extrema importância, pois propicia a identificação das bactérias e de seu metabolismo. O longo tempo necessário para o diagnóstico por microbiologia convencional é uma das causas da procura por métodos mais rápidos, com maior ou mesma eficiência de resultados.

As provas bioquímicas convêm identificar bactérias através das transformações químicas em um substrato, pela atuação das enzimas do microrganismo. Todo microrganismo possui um sistema enzimático característico que promove a transformação bioquímica. Sendo assim, as provas bioquímicas podem ser empregadas para a caracterização.

A utilização da biologia molecular como auxílio para a averiguação da ocorrência de microrganismos no ambiente industrial proporciona vantagem em relação à microbiologia clássica. As técnicas utilizadas apresentam um perfil detalhado da comunidade microbiana de interesse, ao invés de apenas fornecer informações sobre um pequeno fragmento do biofilme (DALY; SHARP; McCARTHY, 2000).

A análise fenotípica é baseada na caracterização morfológica, identificando o microrganismo pelo gênero e, em alguns casos, até a espécie. As técnicas moleculares auxiliam na diferenciação de grupos de microrganismos, fornecendo informações sobre o DNA (STRINGARI, 2004).

2.4.1 Uso de PCR para Identificação de Microrganismos

A reação em cadeia da polimerase é um método “*in vitro*” para a amplificação de material genético, por meio de uma pequena quantidade de ácido nucleico, obtendo um fragmento específico de DNA de sequência definida (SAIKI et al., 1988).

No ano de 1983, o desenvolvimento da PCR por Kary B. Mullis (MULLIS; FALOONA, 1987) foi respeitado como o grande progresso da biologia molecular. Esta técnica ampliou o alcance da análise de DNA e proporcionou a biologia molecular encontrar novas aplicações até mesmo em áreas fora do campo tradicional, como medicina, agricultura e biotecnologia.

A técnica de PCR é composta por dois oligonucleotídeos sintéticos, complementares as sequências das fitas opostas do DNA alvo em posições contrárias dos extremos do segmento a ser amplificado. Oligonucleotídeos iniciadores, também chamados de *primers* ajudam na iniciação da replicação das cópias do fragmento alvo (LANE et al., 1985).

O sequenciamento de genes, como rRNA (RNA ribossômico), amplificados por PCR é uma das metodologias moleculares mais usuais para a identificação de microrganismos. A técnica de sequenciamento demanda equipamentos específicos e este procedimento apresenta alto custo-benefício (MOREIRA et al., 2005).

A amplificação de uma sequência de DNA por PCR fornece informações para identificar o microrganismo analisado, identificando dentro de uma espécie ou grupo conhecido (NEIVA, 2007). A reação em cadeia da polimerase é uma ferramenta com várias aplicações e por meio dela, partir de uma molécula de DNA, pode-se gerar inúmeras moléculas similares em poucas horas (MULLIS; FALOONA, 1987).

A utilização da região 16S no sequenciamento tem base na existência de sequências conservadas nos genes de DNA da menor unidade dos ribossomos, chamado de rRNA 16S. Esta molécula é encontrada em todas as bactérias, sendo um padrão universal para a sua identificação e classificação (NEIVA, 2007).

Para identificar microrganismos, podem ser associadas técnicas de PCR e sequenciamento de DNA. Assim, podem ser identificados fungos e bactérias de forma rápida (DEVEREUX; HINES; STAHL, 1996).

A técnica de PCR destaca-se da convencional devido ao curto prazo, sendo mais precisa a confirmação do resultado e confiabilidade (MONTEIRO, 2015). Nas técnicas convencionais de isolamento e identificação de microrganismos patógenos, são necessárias várias etapas trabalhosas com extensa duração, podendo levar semanas de enriquecimento e de cultivo em meios seletivos, contrariando a urgência do controle epidemiológico (REVOLLEDO; FERREIRA, 2009).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica molecular simples, mais específica e sensível do que métodos convencionais, podendo ser realizada a partir de qualquer amostra biológica. A seleção dos genes alvo é de extrema importância tanto para a sensibilidade da PCR quanto para a especificidade do microrganismo a ser identificado (ASHFORD et al., 1995).

No caso de *L. monocytogenes*, a análise microbiológica convencional demanda muito tempo, em torno de 14 dias para a confirmação, enquanto que a análise por PCR o resultado pode ser atingido em menos de 24 horas. Frente a um lote de exportação ou de um surto de intoxicação alimentar em que as características da listeriose estejam presentes a pesquisa convencional torna-se demorada (MONTEIRO, 2015).

3 METODOLOGIA

3.1 PROPOSTA METODOLÓGICA

O presente trabalho é classificado do ponto de vista de sua natureza, como aplicado, com o objetivo de gerar conhecimentos para aplicação prática e dirigida à solução de problemas específicos (SILVA; MENEZES, 2005).

Considerando o problema de pesquisa, pode ser classificado como quantitativo e qualitativo, traduzindo em números as opiniões e informações para classificar e analisar dados obtidos, mas, também analisados indutivamente.

O método científico a ser aplicado no presente trabalho será o indutivo, que parte do princípio de dados particulares para a obtenção de uma afirmação não contida nas partes examinadas (LAKATOS, MARCONI, 2005).

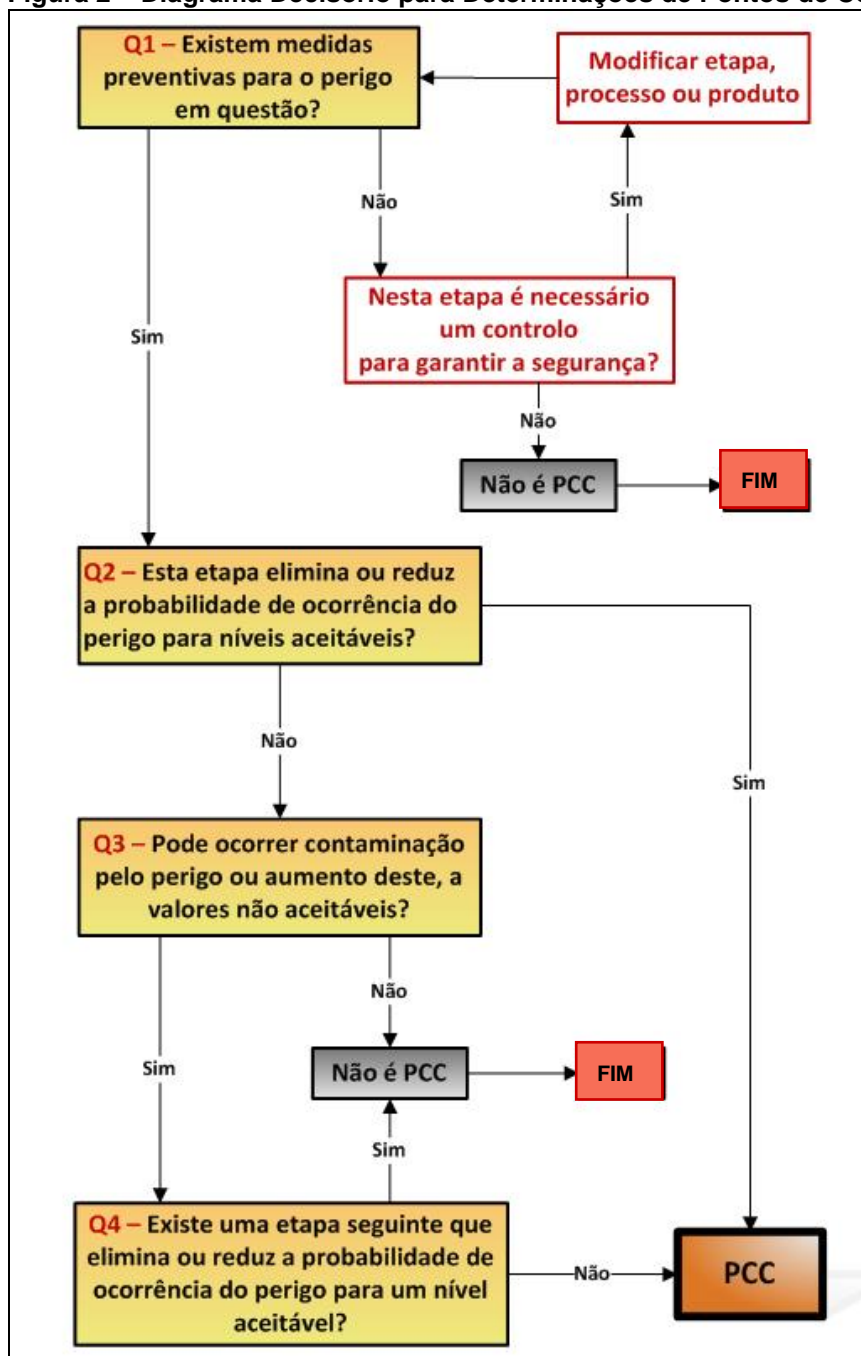
Em relação aos objetivos, estes são classificados como explicativos, visando identificar fatores determinantes para contribuir a ocorrência de fenômenos. Segundo seus procedimentos técnicos, é considerado uma pesquisa experimental, sendo determinado um objeto de estudo, com influência nas variáveis selecionadas e as formas de controle e de observação dos efeitos no objeto (GIL, 1991).

3.2 LOCAL DA PESQUISA E COLETA DAS AMOSTRAS

A pesquisa foi realizada em um frigorífico de produtos processados bovinos, localizado na região dos Campos Gerais – Estado do Paraná. As amostras foram coletadas através do sistema de *swabs* e codificadas conforme o ponto coletado. *Swabs* é uma técnica de esfregaço, que consiste na fricção de um cotonete estéril sobre uma superfície, dentro de um molde estéril com área de 25 cm² com sucessivas passagens, revertendo a direção (SILVA et al., 2001; ABNT, 1998).

O método utilizado para a determinação de pontos de coletas, foi baseado no modelo de “Diagrama Decisório” orientado pela ferramenta de qualidade Análise de Pontos Críticos de Controle (APPCC) baseado em Tobias et al. (2014). A figura 2 demonstra o modelo do diagrama decisório utilizado.

Figura 2 – Diagrama Decisório para Determinações de Pontos de Coleta



Fonte: Tobias et al. (2014)

Os *swabs* com as amostras coletadas foram suspensos em caldo nutriente e conservados sob refrigeração até o local de análise, no Laboratório de Microbiologia da UTFPR – Campus Ponta Grossa, onde foram incubados a temperatura de 35 °C por 24 horas. Após o tempo de incubação, as amostras foram levadas para o

Laboratório de Bioengenharia da UTFPR – Campus Ponta Grossa para as posteriores análises e testes.

3.3 LEVANTAMENTO DO CONTROLE DA QUALIDADE

Para a identificação dos procedimentos de controle de qualidade na indústria de produtos cárneos na qual foram coletadas as amostras, foi realizada uma entrevista com um coordenador de qualidade dessa indústria. O roteiro para a coleta de dados foi adaptado de Alvarenga (2014), no qual a entrevista é dividida em quatro blocos conforme Apêndice 1. O bloco inicial traz questões sobre produtos e processos realizados na empresa e o seguinte aborda as ferramentas de controle de qualidade e sua fase de implantação, bem como os objetivos para a sua utilização. No terceiro bloco, a entrevista questiona sobre a determinação de pontos críticos de controle, como seus critérios para estabelecimento. No quarto bloco da entrevista, são relacionadas as análises provavelmente realizadas no produto, juntamente, com a periodicidade das mesmas.

3.4 ISOLAMENTO POR MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL

Para as análises microbiológicas, levou-se em conta a Circular nº 175 de 2005 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA (BRASIL, 2005). Este departamento aborda produtos destinados ao comércio interestadual ou internacional, e abrange inspeção “*ante*” e “*post mortem*” dos animais, recebimento, manipulação, transformação, elaboração, preparo, conservação, acondicionamento, embalagem, depósito e rotulagem, de quaisquer produtos e subprodutos.

Nas análises microbiológicas utilizou-se os meios de cultura para isolamento de enterobactérias em geral, sendo o meio EMB (Eosin Methylene Blue) e meio de SS (Salmonella Shigella). E para fins de controle de qualidade, foi verificado em meio MSA (Manitol Salt Agar) para um possível crescimento de *Staphylococcus aureus*, para identificar contaminações de origem do ser humano, ou seja, dos

funcionários do frigorífico. Todos os *swabs* foram inoculados para os três meios de cultura acima.

3.4.1 Isolamento por Meio de Cultura EMB - Eosin Methylene Blue

A partir do tubo contendo o caldo nutriente e o *swab* coletado, previamente incubado por 24 horas, foi retirada uma alíquota de 1 mL e inoculada em um outro tubo de ensaio com tubo de Duran, contendo caldo EC – *Escherichia coli*, incubado a temperatura de 44 °C até a presença de gás no tubo de Duran.

Depois do tempo de incubação dos tubos, havendo presença de gás no interior do tubo de Duran, com a alça de platina, foi passada uma alçada do caldo nutritivo para o plaqueamento por esgotamento, em uma placa de Petri contendo meio eosina azul de metileno - EMB, incubada a uma temperatura de 37 °C por 24 horas.

Havendo a presença de colônias típicas, com coloração verde metálico, existe a probabilidade de presença deste microrganismo no meio, com confirmação por meio da análise de PCR.

3.4.2 Isolamento por Meio de Cultura SS – *Salmonella Shigella*

Do caldo nutriente contendo o *swab*, foi inoculado 1 mL em tubo de ensaio com 9 mL de caldo Rappaport, e incubado em estufa à 37 °C por 24 horas. Depois do período de incubação a amostra foi plaqueada em meio Ágar SS (Agar *Salmonella Shigella*) em técnica de esgotamento e incubada a 35 °C por 24 horas.

Se a placa apresentar colônias incolores com centros pretos, resultantes da produção de H₂S, depois do período de incubação, pode haver o provável crescimento de microrganismos relacionados a este meio de cultura.

3.5 PERFIL MOLECULAR DOS ISOLADOS NO PROCESSO PRODUTIVO

3.5.1 Isolamento de DNA

Para a extração de DNA das cepas isoladas, foi utilizado o protocolo recomendado por Olivindo et al. (2009), consistindo em uma amostra inicial de 2,5 mL precipitada em tubos de microcentrífuga com 1,7 mL, por meio de um pulso de centrifugação a 14.000 rpm. O sobrenadante foi eliminado a cada centrifugação, o processo repetido até que todo o volume da amostra (2,5 mL) seja precipitado. Ao *pellet* obtido foi adicionado 700 mL de tampão de extração (1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20mM EDTA, pH8,0; PVP-40 1%; CTAB 2%; Proteinase K, 20mg/mL). A solução foi agitada em vórtex e incubada por 30 minutos a 65 °C em banho-maria, agitada a cada 10 minutos. Foi acrescentado 650 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e a solução foi homogeneizada até formar uma emulsão e centrifugada a 14.000 rpm durante 7 minutos. O processo com 650 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi repetido até que a fase aquosa adquirisse aparência translúcida. O DNA extraído foi precipitado com 1 volume de isopropanol conservado em temperatura ambiente, homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm durante 7 minutos. O sobrenadante foi removido e a superfície do precipitado foi lavada por duas vezes com 70 mL de etanol 70%. A cada lavagem o precipitado foi centrifugado por 2 minutos a 14.000 rpm. O *pellet* foi seco em temperatura ambiente por 30 minutos e ressuspendido em 40 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0 + 10 mg/µL de RNase) alocado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos.

Para a confirmação da extração do DNA, as amostras foram separadas por eletroforese em gel de agarose, sendo 5 µL da amostra, adicionado de 5 µL de TC (tampão de carregamento) durante uma hora em 70 volts. Após este tempo, o gel de agarose foi submerso em solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL por 15 minutos, e fotodocumentadas em transiluminador ultravioleta com o programa LpiX Image.

3.5.2. Reação Para Amplificação - PCR

A reação denominada de “Mix”, contém 0,6 µl de primer rD1, 0,6 µl de primer fD1, na concentração de 10 µM, 5 µl de solução tampão de PCR, 2,5 µL de tampão, 1,5 µL de MgCl₂ na concentração de 50 mM, 2 µL da mistura de nucleotídeos, 0,4 µL de solução Taq polimerase, 2 µL do DNA bacteriano extraído anteriormente, e 15,4 µL água Milli-Q.

Para amplificação do gene foram utilizados os inicializadores universais para o domínio bactéria fD1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Segundo Weisburg et al. (1991), os iniciadores correspondem às posições 8 a 27 e 1524 a 1540 do gene 16S rRNA em *Escherichia coli*, respectivamente.

A amplificação do DNA por PCR foi realizada no termociclador, situado no Laboratório de Bioengenharia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Ponta Grossa, segundo metodologia descrita por Olivindo et al., (2009) sendo 1 minuto a 96 °C, 30 ciclos de 20 segundos a temperatura de 64 °C, para o anelamento dos primers será de 30 segundos a 55 °C e mais 2 minutos a 72 °C, mais 5 minutos a 72 °C para a extensão final.

Para a visualização dos produtos da PCR, as amostras foram depositadas por eletroforese em gel de agarose, sendo 5 µl da amostra, adicionado de 5 µl de TC (tampão de carregamento), durante 60 minutos em 70 volts. Após, foi submerso em solução de brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL por 15 minutos, e fotodocumentadas em transiluminador ultravioleta com o programa LpiX Image.

3.5.3 Sequenciamento do produto da PCR

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do primer (rD1 e fD1) e 0,5 mL do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP

Cycler com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavadas com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 mL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (Applied Biosystems) com os parâmetros Dye Set “Z”; Mobility File “KB_3500_POP7_BDTv3.mob”; BioLIMS Project “3500_Project1”; Run Module 1 “FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100”; e Analysis Module 1 “BC-3500SR_Seq_FASTA.saz”.

As sequências resultantes foram alinhadas, com auxílio do programa BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparadas com as sequências depositadas no GenBank.BLAST, na página do Nacional Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.5.4 Purificação das amostras para sequenciamento

Para melhores resultados no sequenciamento das amostras, foi realizado purificação dos produtos da PCR utilizando polietilenoglicol – PEG. Onde foi adicionado 1 volume de PEG ao microtubo contendo o produto da PCR, incubando em banho seco por 30 minutos a 37 °C. Após o período de incubação, os microtubos foram submetidos a centrifugação por 20 minutos a uma velocidade de 13.000 rpm, descartando o sobrenadante após o término da centrifugação, adicionando 125 µL de etanol gelado a 80%, centrifugando por 2 minutos a velocidade de 13.000 rpm, descartando o sobrenadante novamente. Adiciona-se 125 µL de etanol gelado a 96%, descartando o sobrenadante mais uma vez sem a necessidade de centrifugação. Após este processo, é necessário evaporar o etanol residual em banho seco por 10 minutos a 70 °C, ressuspensando o produto da PCR purificado com 15 µL de água miliQ, deixando em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas antes de visualizar no gel e agarose a 1,8% (SELENSKA; KLINGMULLER, 1991).

3.5.5 Identificação Genotípica

Para a identificação genotípica das bactérias analisadas, foram utilizados programas computacionais para alinhamento e construção da árvore filogenética, como o ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e o MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007). De posse do alinhamento, a árvore filogenética foi construída, utilizando-se o método de distância de neighbor-joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987), com base no modelo evolutivo Kimura 2 parâmetros, considerando-se, apenas, as regiões do gene que apresentaram máxima identidade para todas as sequências analisadas.

O método NJ é utilizado a fim de minimizar a soma dos tamanhos de todas as arestas da árvore. Assim, as duas espécies são designadas como vizinhas e são ligadas, uma nova espécie combinada é criada, sendo que as espécies agrupadas são retiradas da matriz.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTROLE DE QUALIDADE NA INDÚSTRIA DE PRODUTOS CÁRNEOS

A entrevista na indústria de produtos cárneos foi realizada junto a uma coordenadora de qualidade, com formação e pós-graduação na área de gestão da qualidade. Dentre os principais produtos produzidos estão as carnes bovinas resfriadas e congeladas, com e sem osso e os processos fundamentais consistem em desossa, refile, embalagem primária e secundária.

Para Matsubara (2005), os programas de controle de qualidade minimizam os riscos de contaminação biológica, química e física, abrangendo todos os requisitos higiênico-sanitários como instalações, equipamentos, utensílios, condições da matéria prima.

Quando se questionou sobre os programas de qualidade implantados, foram citados: Boas Práticas de Fabricação (BPF), Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (APPCC), Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Monitoramento de Pragas (MIP) e Folha de Verificação (FV). Apenas duas das ferramentas citadas no referencial teórico não são implementadas: ISO 9000 Gestão da Qualidade e Controle Estatístico de Processo – CEP.

Conforme Forsythe (2005), em toda a cadeia produtiva, há a necessidade da integração de ferramentas e programas da qualidade como BPF, PPHO, Gerenciamento da Qualidade (ISO) e APPCC. Os programas BPF E PPHO são pré-requisitos para a implantação do sistema APPCC (CUSATO, 2007). Programas pré-requisitos tem a função de identificar os perigos potenciais à segurança do alimento, desde a obtenção das matérias primas até seu consumo, estabelecendo Pontos Críticos de Controle, como medidas de controle e monitoramento para garantir a produção de um alimento seguro e de qualidade (BRASIL, 2002). O APPCC como ferramenta da qualidade atua de forma corretiva, possibilitando executar a ação no decorrer do problema; a preventiva estabelece medidas antes que o problema ocorra e a preditiva monitora as etapas do processo levando em consideração sua criticidade (DIAS; BITTENCOURT; KOVALESKI, 2014).

Dependendo do ramo de atividade da organização, existem diferentes ferramentas de Gestão da Qualidade a serem aplicadas. No caso de empresas que

atuam no ramo frigorífico de bovino, tais ferramentas são requisitos fundamentais para o seu funcionamento, de maneira a atender normas e legislações de segurança e qualidade dos produtos. Conforme trabalho realizado por Araújo (2010), as ferramentas, sistemas e metodologias do frigorífico variam de acordo com as etapas do processo produtivo.

Na empresa em estudo, os principais objetivos para tais implementações de ferramentas de qualidade são sanar problemas de produção, aumento de produtividade, reduzir perdas no processo produtivo, e principalmente, atender à legislação. Nessa situação, os pontos críticos de controle de qualidade são determinados pelo risco de contaminação cruzada no produto e a partir da descrição da legislação de alimentos vigente.

A avaliação da eficácia das ferramentas e dos programas para o controle da qualidade é realizada por meio de análises microbiológicas, físico-químicas e dos resultados de comercialização dos produtos. Sendo que a empresa envia mensalmente amostras de carne para realização de análises físico-químicas e microbiológicas em laboratório credenciado, por se tratar de um produto processado.

A resolução da Vigilância Sanitária (RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004), estabelece procedimentos de Boas Práticas para serviços de alimentação a fim de garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Esta resolução aplica-se aos serviços de alimentação que realizam algumas das atividades: manipulação, preparação, fracionamento, armazenamento, distribuição, transporte, exposição à venda e entrega de alimentos. Abrange os seguintes itens: alimentos preparados, anti-sepsia (visando a redução da carga microbiana), boas práticas, contaminantes (químico, físico ou microbiológico), controle integrado de vetores e pragas urbanas (sistema que incorpora ações preventivas e corretivas destinadas a impedir a atração, o abrigo, o acesso e ou a proliferação de vetores e pragas urbanas), higienização (limpeza e sanificação), limpeza, manipulação de alimentos (qualquer manuseio ou operação efetuada na matéria-prima), os manipuladores de alimentos, o manual de boas práticas de fabricação, as medidas de controle, produtos perecíveis (*in natura*), registro (planilhas de anotações), resíduos (qualquer rejeito produzido), saneantes (produtos químicos utilizados durante a higienização), o serviço de alimentação (estabelecimento onde a matéria-prima é manipulada) e os Programas Operacionais Padronizados, contendo procedimentos que descrevem e

estabelecem instruções sequenciais para a realização de operações rotineiras e específicas na manipulação de alimentos.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

De acordo com o método de diagrama decisório foram estabelecidos 25 pontos de coletas de amostras no processo produtivo, identificados como possíveis meios de contaminação do produto. Os pontos estão distribuídos em sete setores, sendo de recepção, armazenamento em refrigeração, pré-corte, desossa, embalagem, refrigeração de produto final e expedição, demonstrados na figura 3.

Figura 3 – Fluxograma dos pontos de coleta de amostras no processo produtivo



Fonte: Autoria própria

Legenda: 1 – facas, 2 – maçaneta da camara, 3 – armário de utensilios, 4 – capa de lombar, 5 – luva de malha de aço, 6 – facas, 7 – tábuas, 8 – ganchos. 9 – armário de esterilização de facas, 10 – chairas, 11 – máquina de carne moída, 12 – mãos manipuladores, 13 – esteira, 14 – caixa branca para produto, 15 – serra fita, 16 – skinner, 17 – luva manipulador skinner, 18 – faca, 19 – cubas de inox, 20 – mesas, 21 – limpador de osso, 22 – porta de expedição, 23 – maçaneta da porta de expedição, 24 – uniforme manipulador, 25 – camara de osso.

4.3 ANÁLISE DOS MICRORGANISMOS PRESENTES NO PROCESSO PRODUTIVO

Os coliformes fazem parte da família *Enterobacteriaceae* tendo inúmeras características em comum com o gênero *Salmonella* e *Shigella*, as sendo na maioria microrganismos patogênicos. A principal diferença é bioquímica, sendo que coliformes fermentam a lactose com produção de ácido e gás, e *Salmonella* e *Shigella* não apresentam esta característica (GRANUM et al., 2001).

De acordo com as análises microbiológicas realizadas nos 25 pontos amostrais com três meios de cultura seletivos, em 10 pontos foi notado o crescimento positivo nos meio SS e EMB, com pontos amostrais e respectivos pontos com crescimento positivo demonstrados no Quadro 2. O meio EMB (eosina-azul de metileno) tem por finalidade isolar os principais microrganismos gram-negativos encontrados em diferentes amostras, especialmente enterobactérias, permitindo notar a fermentação da lactose pelas bactérias em dois grupos: fermentadores da lactose, como por exemplo coliformes, e os não fermentadores da lactose, como exemplo a *Salmonella* e *Shigella*. As colônias de coliformes geralmente têm um centro escuro e um brilho metálico esverdeado (DIFCO; BBL MANUAL, 2003).

O meio de cultura SS é considerado um meio seletivo com base no grau de inibição dos microrganismos gram-positivos e outras enterobactérias que não a *Salmonella* e a *Shigella*. A diferenciação de microrganismos advém através da incorporação de lactose no meio. Os microrganismos fermentadores de lactose produzem ácido, resultando na formação de colônias vermelhas. Os microrganismos não fermentadores da lactose formam colônias incolores. Este último grupo contém a maioria dos elementos patogênicos intestinais, incluindo *Salmonella* e *Shigella*. (MURRAY et al., 2003).

Destaca-se 2 pontos amostrais com crescimento positivo para o meio MSA, detectando a provável presença de *Staphylococcus aureus* no processo produtivo do frigorífico. O meio de cultura MSA é utilizado para o isolamento seletivo de estafilococos e para a detecção de *Staphylococcus aureus* provenientes de diversas amostras. Este meio de cultura contém peptonas e extrato bovino, que fornecem nutrientes essenciais para o crescimento de alguns microrganismos. O cloreto de

sódio a concentração de 7,5% resulta numa inibição parcial ou completa de outros microrganismos, exceto estafilococos. A fermentação com manitol é apontada por uma alteração no indicador vermelho de fenol, ajudando na diferenciação das espécies de estafilococos (MURRAY et al., 2003).

Quadro 2 – Resultado do crescimento positivo ou negativo de amostras isoladas nos meios EMB, SS e MSA a partir de 25 pontos em um processamento frigorífico

Pontos de coleta	Meio EMB	Meio SS	Meio MSA
1 – Facas	-	-	-
2 – Maçaneta da câmara	-	-	-
3 – Armário de utensílios	+	+	-
4 – Capa de lombar	-	-	-
5 – Luva de malha de aço	+	+	-
6 – Facas	-	-	-
7 – Tábuas	-	-	-
8 – Ganchos	+	-	-
9 – Armário Esterilização de facas	-	+	+
10 – Chairas	+	+	-
11- Máquina de carne moída	+	+	-
12- Mãos manipuladores	+	-	-
13 – Esteira	+	-	-
14 – Caixa branca para produto	+	+	-
15 – Serra fita	+	-	-
16 – Máquina Skinner	-	-	-
17 – Luva manipulador do Skinner	-	+	-
18 – Faca do PCC	+	+	-
19 – Cubas de inox	-	-	+
20 – Mesas	-	-	-
21 – Limpador de osso	-	+	-
22 – Porta expedição	-	+	-
23 – Maçaneta câmara exped.	-	-	-
24 – Uniforme	-	-	-
25 – Câmara de osso	-	-	-
Total de pontos encontrados	10	10	2

Fonte: Autoria própria

A partir da Figura 2 observou-se que a contaminação se inicia no armário de utensílios, na etapa de recepção de matéria prima, com presença de enterobactérias, dando continuidade à contaminação na etapa de desossa e fabricação, presente na luva de malha de aço.

Estes resultados também são notados no trabalho de Akkaya et al. (2008), onde denotou a presença de microrganismos patogênicos no período de março a agosto de 2005, em um frigorífico localizado na Turquia. O pesquisador avaliou 250 amostras de carcaças bovinas e observou prevalência de *Salmonella spp.* em 10%, *Listeria monocytogenes* em 6,8% e presença de *Escherichia coli* em 3,2% das amostras. Estes microrganismos fazem parte da família de enterobactérias, com exceção de *Listeria*.

Nos pontos 22, 23, e 25, porta de expedição, a maçaneta e a câmara de osso, respectivamente, há uma contaminação instalada, pois são locais não higienizados diariamente. Isso difere das contaminações oriundas de manipuladores, conforme presenciado na luva de malha de aço (ponto 5), a caixa branca (ponto 14), a luva do manipulador do skinner (ponto 17), locais nos quais há necessidade de sanitização diariamente. Porém, como ficou demonstrado, não tem sido eficiente por parte do manipulador.

No armário de facas (ponto 9), chairas (ponto 10), máquina de carne moída (ponto 11), faca (ponto 18), há contaminação de utensílios, sendo que a sanitização dos mesmos não tem sido eficiente. Em todos os pontos descritos tivemos a presença de microrganismos em utensílios, os quais a longo prazo podem conduzir à formação de biofilmes. Com isso, há a propagação destes microrganismos, bem como, a contaminação cruzada nos produtos, principalmente, localizada no armário de utensílios (ponto 3).

No estudo de Morita et al. (2005), a área de processamento houve o maior caso de contaminação por microrganismos patogênicos, no recebimento da matéria prima, não houve ocorrência de contaminação, no armazenamento e expedição, 9,1% das amostras estavam contaminadas. Alguns microrganismos podem se manter viáveis por meses no meio ambiente, tendendo a ser endêmicos em plantas de processamento de produtos de origem principalmente animal, através da formação de biofilmes e adesão em superfícies utilizadas na indústria.

Nas etapas finais, embalagem secundária, refrigeração de produto final e expedição, houve apenas 1 ponto onde foi observado o crescimento no meio de cultura SS, ocorrendo na porta de expedição da indústria frigorífica.

No armário de esterilização de facas (ponto 9) e nas cubas de inox (ponto 19), teve confirmação microbiológica para a possível presença de *Staphylococcus aureus*, havendo o crescimento em meio de cultura MSA, sendo não habitual para carnes. De acordo com Germano e Germano (2001), as bactérias do gênero *Staphylococcus* são habitantes usuais, da pele, das membranas mucosas, do trato respiratório superior e do intestino do ser humano, não havendo contaminação diretamente dos animais ou das carcaças.

Com estes resultados, surgiu a pergunta da origem da presença destes microrganismos no processo produtivo. Assim, realizou-se uma busca bibliográfica para levantar a fundamentação dos mesmos na linha de produção. Abaixo será apresentado a fundamentação de enterobactérias e microrganismos de origem estafilocócica.

4.3.1 Origem de Enterobactérias no Processo Produtivo

A origem de enterobactérias na carne está associada com a manipulação e com as superfícies do local de trabalho. São microrganismos deteriorantes da família *Enterobacteriaceae*, podendo multiplicar-se em proporções significativas na carne embalada a vácuo ou em atmosfera modificada quando estocada em temperaturas maiores que 10° C (PENNEY et al., 1993). A presença de enterobactérias é um indicador para possível contaminação fecal decorrente de um inadequado processamento ou contaminação pós-processamento do produto (TORNADIJO et al., 2001).

Os alimentos envolvidos em surtos e em caso de infecção por enterobactérias são na maioria de origem animal, particularmente bovina. A contaminação da carcaça bovina pode ocorrer durante o abate. O trato gastrointestinal dos bovinos funciona como um reservatório deste microrganismo. A *Escherichia coli* predomina na microbiota anaeróbica facultativa do trato gastrointestinal dos humanos e dos animais de sangue quente, como os bovinos (MORENG; AVENS, 1990).

O pH ácido do rúmen de bovinos confinados deveria ter influência sobre a toxina excretada por microrganismos, mas tais toxinas desenvolveram resistência a acidez. Comumente a acidez estomacal dos bovinos é uma barreira contra a infecção dos patógenos nos alimentos, mas a adaptação da toxina STEC produzida pela bactéria, a torna capaz de sobreviver a este mecanismo de defesa (CRAY, 1995). A contaminação ocorre devido ao contato com material fecal de animais infectados ou com superfícies contaminadas com enterobactérias (NATRO; KAPER; 1998). A utilização do manejo alimentar adequado é de extrema importância para minimizar o desenvolvimento de *Enterobacteriaceae*, uma vez que animais bem nutridos e sadios possuem menores populações de cepas patogênicas (RASMUSSEN et al., 1993; SCOT et al., 2008)

Em crescimento positivo no meio de cultura EMB, foram identificados 10 pontos, entre eles: armário de utensílios (ponto 3), luvas de malha de aço (ponto 5), ganchos (ponto 8), chairas (ponto 10), máquina de carne moída (ponto 11), mãos manipuladores (ponto 12), esteira (ponto 13), caixa branca de produtos (ponto 14), serra fita (ponto 15) e faca (ponto 18) da linha de produção no presente estudo. A presença destes microrganismos pode estimar falhas na higiene e indicar contaminação de origem de conteúdo gastrointestinal bovino, sendo que a presença deste microrganismo pode estar relacionada a níveis significativos de enteropatógenos (DUCAS; SILVA, 2011).

A contaminação da superfície da faca pode originar-se da recepção, onde o utensílio tem contato com a matéria prima oriunda do abatedouro. As primeiras incisões na pele, bem como parte da esfolia, são realizadas com faca, que pode ser contaminada pela superfície da carcaça. Outras contaminações, nesta fase do trabalho, são provenientes do contato da superfície da carcaça com a pele já separada ou com as mãos dos operários (ROÇA, 2004).

Os principais pontos identificados estão envolvidos com o manipulador, principalmente em suas mãos, o outro ponto é nos equipamentos, como esteira e máquina de moer carne. Contudo, se qualquer peça do equipamento de moer for de difícil sanitização, é provável que essas tarefas não serão realizadas corretamente, havendo acúmulo de produtos e proliferação de bactérias patogênicas, aumentando os riscos de contaminação cruzada em toda área destinada ao processamento (OLIVEIRA et al., 2008).

O ponto onde teve crescimento positivo no meio EMB é a faca e corte, a qual é considerada um ponto crítico de controle no processo (ponto 18) pela responsável da área de qualidade. A presença deste microrganismo na faca dos manipuladores demonstra que este objeto não está sendo esterilizado corretamente ou manuseado de forma errônea em relação a contaminação. A circular n° 175/2005, do MAPA, descreve a esterilização das facas por 20 segundos a 82 °C após cada operação, porque pode ocorrer uma contaminação da carcaça mais extensa por conteúdo gastrointestinal.

Em estudo publicado por Elder et al. (2000), o processo de evisceração é um ponto crítico de controle para a contaminação das carnes, com isso, medidas de controle devem ser adotadas. A contaminação pode se dar através da utilização de utensílios mal higienizados ou não sanitizados, não higienização das mãos entre a manipulação em setores alimentícios diferentes e má higienização do manipulador após o uso do sanitário (SILVA; MENEZES, 2005).

Segundo Riedel (2005), a carne bovina moída é a maior responsável pela ocorrência de surtos de *Escherichia coli*, quando consumida crua ou mal cozida. A contaminação deve-se também de água contaminada com dejetos de esgoto, sendo umas das mais importantes vias de transmissão na natureza. Alimentos expostos a contaminação fecal, seja através da água de preparo ou dos manipuladores infectados, são formas de transmitir a bactéria. Conforme RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, carnes resfriadas, ou congeladas, "*in natura*", de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes), devem apresentar no máximo 10⁴ UFC/grama de produto (BRASIL, 2001).

Segundo Ducas e Silva (2011), microrganismos pertencentes ao gênero *Enterobacteriaceae* adentram na planta de abate a partir dos animais vivos e dos colaboradores, não existindo procedimentos de inspeção especificamente direcionados para o controle desses microrganismos, apesar de estarem relacionados como principais riscos para a saúde pública. No presente processo produtivo deste frigorífico, evidencia-se o crescimento positivo em meio SS desde o armário de utensílios (ponto 3) até a expedição (ponto 22). Deste modo, estes microrganismos patogênicos estão presentes nos utensílios no decorrer do processo produtivo, possivelmente em forma de biofilme bacteriano, destacando a faca (ponto 18), considerada pelo responsável da qualidade como um ponto crítico de controle a ser rigorosamente inspecionado e analisado. Um possível ponto de formação de

biofilme é a caixa branca (ponto 14), onde armazena-se os produtos acabados destinados a área de embalagem, facilitando a propagação destes microrganismos tanto na forma de células bacterianas ou em configuração de biofilmes até a área de expedição.

Os resultados obtidos com essa pesquisa cogitam as fontes de contaminação por enterobactérias, evidenciando a ineficiência dos procedimentos de higienização e o treinamento ineficiente dos funcionários. Terra e Fries (2001) verificaram que a carga microbiana presente no couro do animal pode exceder a 10^9 UFC/cm², podendo contaminar a carcaça nas etapas iniciais do abate, por isto a importância da higiene do animal *ante-mortem*, evitando assim a posterior contaminação na etapa do processamento da carne. Para Mantilla et al. (2007), a contaminação durante o abate pode ocorrer a partir da manipulação da carne pelos funcionários, uma vez que esses podem ser portadores sadios de microrganismos patogênicos como *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.* e *Escherichia coli* enteropatogênica.

O estudo identificou o crescimento positivo em meio de cultura SS em 10 pontos da linha de produção. Esses pontos de presença contribuíram para a disseminação da mesma, como consequência futura, a propagação de doenças relacionadas com este microrganismo, sendo uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos (DTA) causando salmonelose e febre tifoide (ARSLAN; EYI, 2010). Os pontos onde foram identificados estão na maioria relacionados com o manipulador, é o caso das luvas de malha de aço e faca, considerado pelos coordenadores de qualidade da indústria frigorífica em questão, como um ponto crítico de controle (PCC), além dos armários de utensílios e esterilização de facas, bem como a porta de expedição.

Os resultados deste estudo, confirmam com os apresentados por Bosilevac et al. (2009), estes autores pesquisaram em sete abatedouros de pequeno porte, nos Estados Unidos, onde 1950 carcaças analisadas, 58% das amostras obtiveram presença de *Salmonella spp.*

Estudos em frigoríficos para enterobactérias do gênero *Salmonella* são de extrema importância, pois os principais alimentos envolvidos em surtos de contaminação registrados, são aqueles que possuem alto teor de umidade e com alta porcentagem de proteína (GERMANO; GERMANO, 2001). Portanto a carne é uma

matéria prima de alto valor nutritivo para o crescimento, quanto para outros microrganismos. Por exemplo, a carne magra bovina apresenta em torno de 75% de água, 21 a 22% de proteína, 1 a 2% de gordura, 1% de minerais e menos de 1% de carboidratos (SEUß, 1991), propiciando o crescimento de *Salmonella spp.* e o aumento de casos de salmonelose, se não houverem cuidados na higienização da planta de produção. De acordo com a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, na categoria de carnes e produtos cárneos, as carnes resfriadas, ou congeladas, "in natura", de bovinos, suínos e outros mamíferos (carcaças inteiras ou fracionadas, quartos ou cortes); carnes moídas; miúdos de bovinos, suínos e outros mamíferos, deve-se constatar a ausência de *Salmonella spp.* em 25 g amostrais (BRASIL, 2001).

Os resultados encontrados no presente estudo, estão de acordo com o proposto por Schraft et al. (1992), que afirma que em plantas de processamento de carne, enterobactérias podem ser frequentemente identificadas sobre as superfícies de trabalho e equipamentos, demonstrando que pode ocorrer a contaminação cruzada entre carcaça. Neste trabalho dos 25 pontos amostrados foi microbiologicamente constatado crescimento positivo no meio SS nos seguintes pontos: armário de utensílios (ponto 3), luva de malha de aço (ponto 5), armário de esterilização de facas (ponto 9), chairas (ponto 10), máquina de carne moída (ponto 11), caixa branca de produto (ponto 14), luva manipulador (ponto 17), limpador de osso (ponto 21) e porta expedição (ponto 22). Segundo Fonseca et al. (2013), as mãos dos colaboradores são consideradas uma das principais causas de doenças veiculadas por alimentos, sendo que as mãos contaminadas são reservatórios de vários agentes patogênicos, tais como o *Staphylococcus spp.*, *Salmonella spp.*, e *Escherichia coli*.

As superfícies dos utensílios podem formar biofilmes oriundos de microrganismos patogênicos para a saúde humana, tornando-se um ponto estático para contaminação cruzada dos produtos. Apesar das mãos do manipulador não terem condições de formarem biofilme, acaba sendo um meio de propagação do microrganismo de uma maneira mais rápida na linha de produção, onde o mesmo tenha contato.

Segundo Borch (1996), o trato digestório dos animais naturalmente abriga diversos tipos de microrganismos patogênicos, sendo que durante o processo de abate podem contaminar partes internas expostas, incluindo-se os músculos,

anteriormente considerados estéreis. Para Matsubara (2005) evidencia a necessidade de rigoroso controle das práticas desde a etapa de abate, é de extrema importância para redução dessa contaminação.

Neste estudo, dos 10 pontos amostrados com crescimento positivo no meio de cultura SS, 60% pontos são considerados utensílios e equipamentos, como armário de utensílios (ponto 3), armário de esterilização de facas (ponto 9), chairas (ponto 10), máquina de carne moída (ponto 11), faca (ponto 10) e limpador de osso (ponto 21), e 40% pontos amostrados relacionados diretamente com o manipulador, como a luva de malha de aço (ponto 5), a caixa branca de produtos destinados a embalagem (ponto 14), luva do manipulador (ponto 17) e a porta de expedição (ponto 22).

4.3.2 Origem de Estafilococos no Processo Produtivo

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são habitantes usuais, da pele, das membranas mucosas, do trato respiratório superior e do intestino do ser humano (GERMANO; GERMANO, 2001), destacando-se entre elas o *Staphylococcus aureus*, sendo a bactéria mais perigosa para o homem (TRABULSI; TOLEDO, 1999). No estudo o *Staphylococcus aureus* foi identificado em dois pontos, armário de facas esterilizadas e cubas de aço inox, o que pode acarretar em uma contaminação cruzada do produto, ocasionando perda de qualidade (PEREIRA; KOVALESKI, 2013). Concluindo assim, que os pontos confirmados microbiologicamente com crescimento positivo em meio MSA, devem-se ao fato de contaminação bacteriana oriunda dos manipuladores, onde não foi realizado uma assepsia correta antes do manuseio dos produtos e dos equipamentos, como o armário de facas já esterilizadas (ponto 9) e as cubas de inox (ponto 19), onde foram encontradas. Os alimentos envolvidos em surto de intoxicação estafilocócica possuem alto teor de umidade e alta porcentagem de proteína, tendo como exemplo carnes e produtos derivados de bovinos, de suínos e de aves (GERMANO; GERMANO, 2001).

Os manipuladores são um dos principais veículos de contaminação dos produtos, sua participação chega a 26% dos surtos de toxinfecção alimentar registrados. Podem ser manipuladores em estado doentio, apresentando higiene

pessoal inadequados, e que usem métodos sem sanitização correta na preparação de alimentos (ANDRADE; BRABES, 2003).

Compagnol et al. (2009) observam que em estabelecimentos industriais, o moedor de carne, as facas de corte e utensílios não são frequentemente limpos para prevenir a propagação de microrganismos. O conjunto de todo o processo de produção, incluindo cortes de carnes, embutidos, enlatados, entre outros, nos quais são aplicados modernos instrumentos de gerenciamento voltados para a qualidade, é visualizado como um macroprocesso. Este é composto de vários processos, agrupados em quatro grandes categorias: matéria-prima, instalações e equipamentos, pessoal e metodologia de produção, todos eles, direta ou indiretamente, envolvidos na qualidade higiênico-sanitária do produto final (MAPA, 2005).

Para garantir maior segurança no controle de qualidade alimentar, atualmente os alimentos vem passando por mudanças tecnológicas. Dentre elas a introdução e operações automatizadas, com o mínimo ou nenhum contato com manipuladores, embalagens e formulações mais eficientes contra microrganismos patogênicos. Além de implantação de recursos para identificação da disseminação de microrganismos na linha de produção (NASCIMENTO; STAMFORD; 2000).

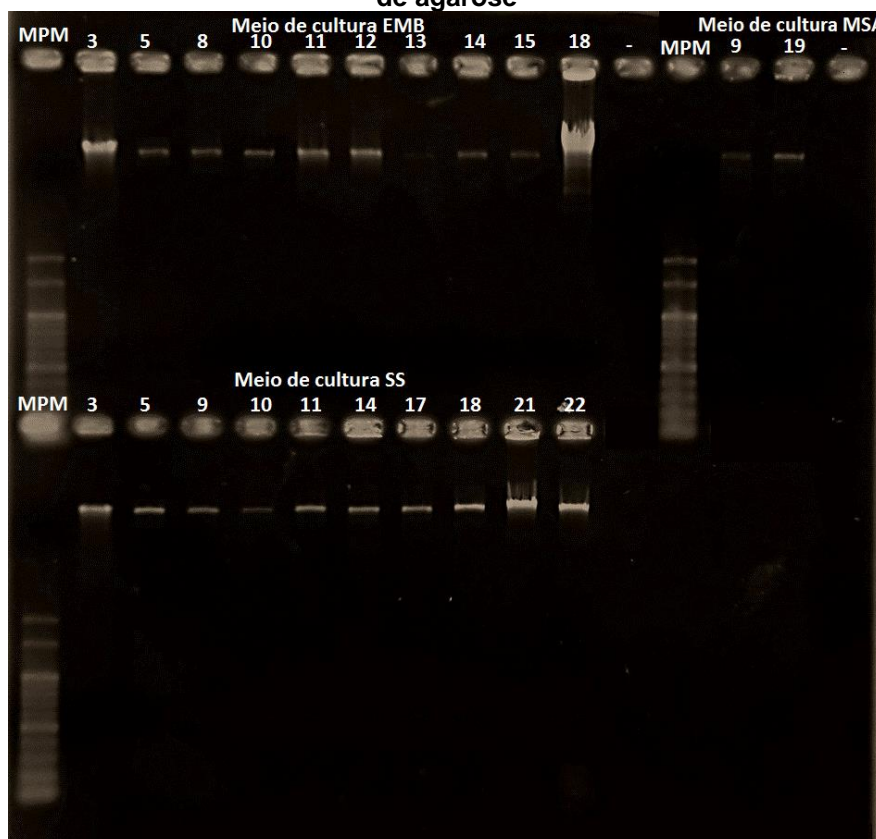
4.4 VERIFICAÇÃO DA IDENTIDADE DOS PATÓGENOS ISOLADOS DO PROCESSO PRODUTIVO

4.4.1 Isolamento de DNA

O método de extração de DNA emprega CTAB, um componente que desfavorece a ação de enzimas degradantes e de DNAses endógenas, sendo um detergente que solubiliza as membranas e facilita a precipitação do complexo formado com o DNA. Este detergente está associado ao EDTA, um composto quelante de cátions, que inibindo a ação de DNAses que usam metais como cofatores. As extrações com métodos que utilizam CTAB, fornecem DNA suficientemente puro para a amplificação por PCR (GONÇALVES, 2006). Na Figura 4, é apresentado o DNA extraído das amostras com crescimento positivo nos três meios de cultura citados acima, visualizadas em gel de agarose, onde obteve-se 22

amostras, sendo 20 amostras com crescimento positivo em meio de cultura EMB, 10 pontos positivos em meio SS e 2 amostras com crescimento positivo em meio estafilocócica no meio de cultura MSA.

Figura 4 – Amostras de DNA extraídas por método CTAB visualizadas por eletroforese em gel de agarose



Fonte: Autorial própria.

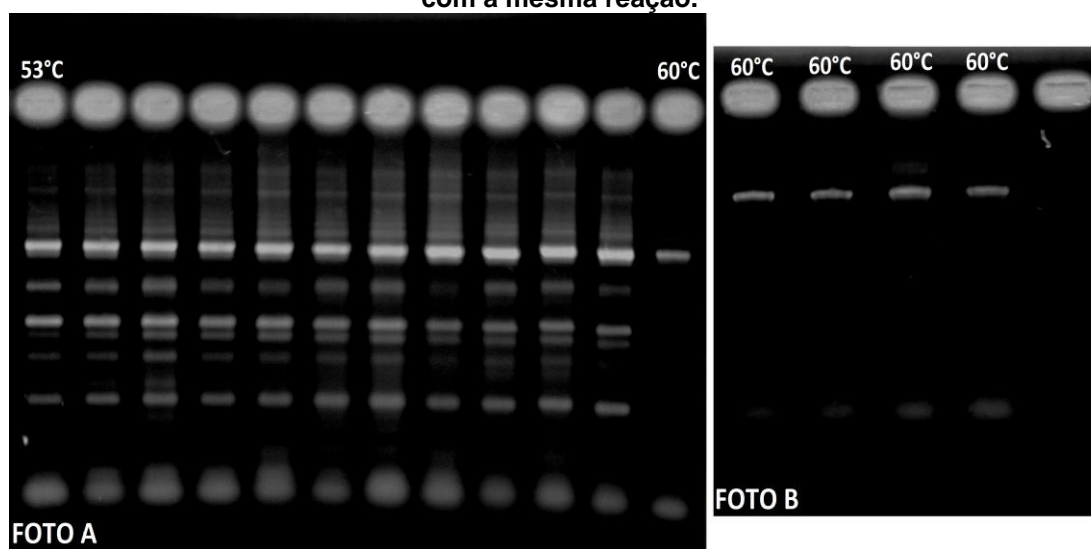
4.4.2 Ajustes para a Amplificação Com Iniciadores Universais (rD1 e fD1)

A amplificação de DNA necessitou de ajustes, de acordo com a literatura, as condições de ciclo eram 1 minuto a 96 °C, 30 ciclos de 20 segundos a temperatura de 64 °C, para o anelamento dos primers de 30 segundos a 55 °C e mais 2 minutos a 72 °C, mais 5 minutos a 72 °C para a extensão final. Entretanto, para estas condições não foram obtidos produtos de leitura para sequenciamento, assim houve a necessidade de estabelecer nova temperatura de anelamento, a qual foi realizada

por um PCR em gradiente, que consiste em um teste de temperatura, onde o experimento realiza iguais condições de reação, variando apenas a temperatura.

Na Figura 5, FOTO A, há o produto de amplificação no teste de PCR em gradiente, variando a temperatura de anelamento entre 53 °C a 60 °C, sendo a última banda a de melhor nitidez, que consiste na temperatura de 60 °C, ideal de anelamento para estas amostras. Na Figura 5, FOTO B, há o produto de amplificação após a determinação das condições ideais, para a mesma amostra, com cepa padrão de *Salmonella spp.*

**Figura 5 – Produtos de PCR em gradiente de temperatura visualizadas em gel de agarose 1,8%
Foto A – Teste de PCR com gradiente de temperatura de 53 °C a 60 °C.
Foto B – Confirmação de temperatura de anelamento em 60 °C para a mesma amostra de DNA
com a mesma reação.**



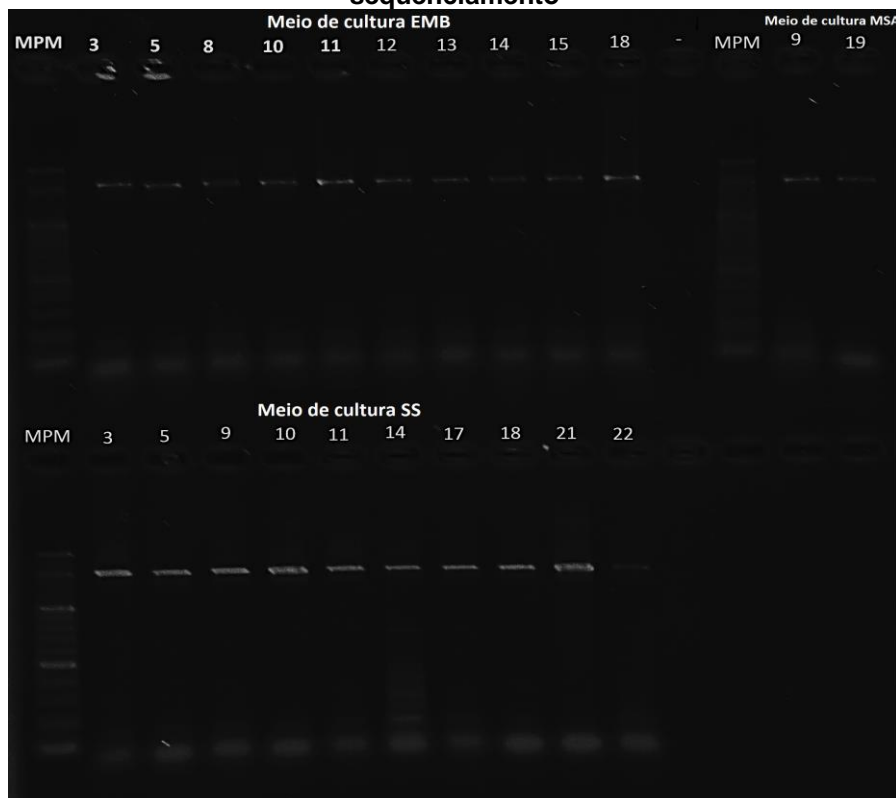
Fonte: Autoria própria.

4.4.3 Sequenciamento dos Produtos da PCR

O sequenciamento foi realizado pela ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS). O preparo da amostra para envio, seguiu o padrão descrito pela empresa. Entretanto para controle das reações enviadas, realizou-se uma PCR com os *primers* rD1 e fD1 universais, que amplificam a região 16S, presente nos genes de todas as bactérias. Este produto de tamanho

1000 pares de base, cujas bandas se encontram no gel de agarose da Figura 6 na página seguinte.

Figura 6 – Produtos da PCR visualizados em gel de agarose 1,8%, enviados para sequenciamento



Fonte: Autoria própria.

Legenda: MPM: Marcador de Peso Molecular

4.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

Das 22 amostras submetidas ao sequenciamento, 20 delas apresentaram sequências possíveis de serem analisadas.

A edição das sequências obtidas foi realizada com o auxílio do pacote do programa Staden versão 1.6. As sequências obtidas foram comparadas com sequências existentes no banco de dados do NCBI - National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), permitindo a detecção de similaridade com sequências caracterizadas já existentes e

inspecionadas visualmente pelo programa MEGA versão 5.1 (TAMURA et al., 2011). A reconstrução filogenética e a obtenção da árvore foram realizadas pelo programa MEGA versão 5.1 (TAMURA et al., 2011).

Como resultado do tratamento pelos programas citados acima, obteve-se as seguintes denominações, demonstradas no Quadro 3.

Quadro 3 – Resultados do sequenciamento do produto da PCR

Fluxograma	Ponto de Coleta	Descrição do Ponto	Meio de Cultura	Resultados Sequenciamento
RECEPÇÃO	3	Armário De Utensílios	EMB	<i>Proteus vulgaris</i>
			SS	<i>Hafnia alvei</i>
DESSOSSA/FABRICAÇÃO	5	Luvas de Malha de Aço	EMB	<i>Proteus vulgaris</i>
			SS	<i>Bacillus subtilis</i>
DESSOSSA/FABRICAÇÃO	8	Ganchos	EMB	<i>Citrobacter freundii</i>
DESSOSSA/FABRICAÇÃO	9	Armário de facas esterilizadas	SS	<i>Enterobacter sp.</i>
			MSA	<i>Bacillus cereus</i>
DESSOSSA/FABRICAÇÃO	10	Chairas	EMB	<i>Bacillus licheniformis</i>
			SS	<i>Bacillus subtilis</i>
DESSOSSA/FABRICAÇÃO	11	Máquina de carne moída	EMB	<i>Escherichia coli</i>
			SS	<i>Klebsiella</i>
DESSOSSA/FABRICAÇÃO	15	Serra fita	EMB	<i>Escherichia coli</i>
DESSOSSA/FABRICAÇÃO	17	Luva funcionário	SS	<i>Hafnia alvei</i>
DESSOSSA/FABRICAÇÃO	18	Faca PCC	EMB	<i>Shigella sonnei</i>
			SS	<i>Bacillus subtilis</i>
DESSOSSA/FABRICAÇÃO	19	Cubas inox	MSA	<i>Providencia vermicola</i>
EMBALAGEM PRIMÁRIA	12	Mãos funcionários	EMB	<i>Hafnia alvei</i>
EMBALAGEM PRIMÁRIA	13	Esteira da embalagem	EMB	<i>Escherichia coli</i>
EMBALAGEM PRIMÁRIA	14	Caixa branca	EMB	<i>Escherichia coli</i>
EXPEDIÇÃO	21	Limpador de osso	SS	<i>Brevibacillus agri</i>

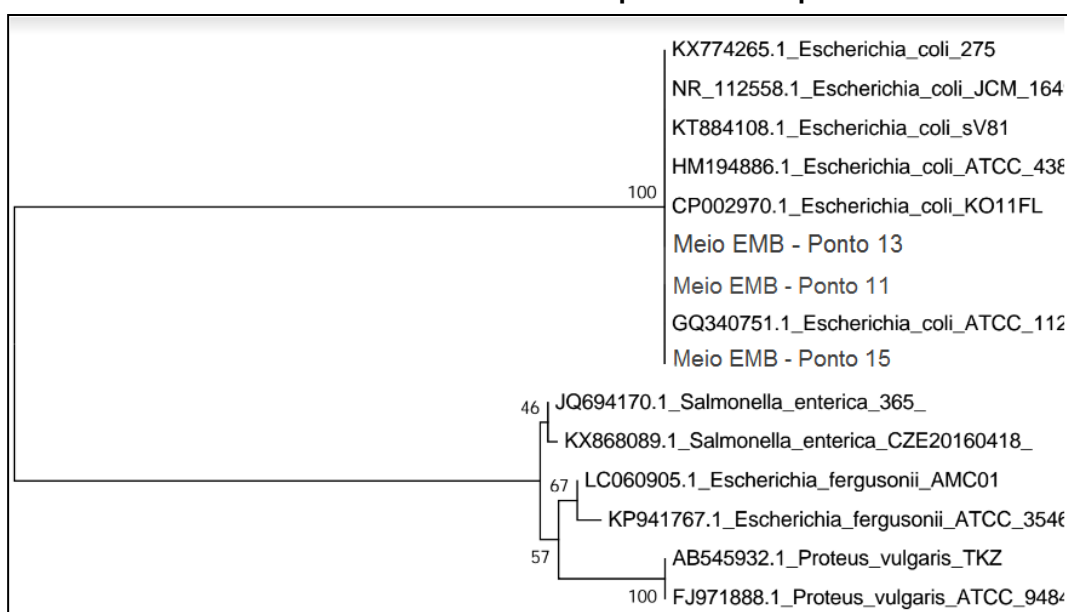
Fonte: Autoria própria.

Foi realizada, neste trabalho, comparação de sequências parciais e os agrupamentos genéticos moleculares para classificação dos microrganismos sequenciados, através de agrupamento filogenético (filogramas). Tais filogramas não

tinham como objetivo realizar classificação filogenética e evolutiva dos microrganismos, mas de auxiliar o agrupamento das sequências não classificadas em relação aos filós a que pertencem.

Como demonstrado na figura 7, a árvore filogenética foi construída com os resultados do sequenciamento para os isolados com crescimento positivo no meio de cultura EMB nos pontos 11, 13 e 15, sendo a máquina de carne moída, esteira da embalagem e serra fita respectivamente. Sendo os pontos onde o resultado do sequenciamento após o tratamento com os programas específicos foram de *Escherichia coli*.

Figura 7 – Árvore filogenética construída com os pontos 11,13 e 15 com crescimento positivo em meio EMB e com resultado de sequenciamento para *E. coli*



Fonte: Autoria própria

4.5 APLICAÇÕES PARA CONTROLE DE QUALIDADE NO PROCESSO PRODUTIVO

A carne bovina está envolvida em surtos de toxinfecções alimentares, veiculando principalmente enterobactérias, estafilococos e clostrídios (GERMANO, GERMANO, 2008). O controle higiênico e sanitário dos alimentos é um fator de grande importância na prevenção das doenças de origem alimentar, pois manipuladores infectados ou contaminados, equipamentos contaminados e a

contaminação cruzada estão associados a surtos de DTAs (FRANCO, LANDGRAF, 2005; GERMANO, GERMANO, 2008).

Os resultados encontrados neste estudo mostram que a maior exposição da carne possibilita as contaminações cruzadas com utensílios, ambiente e manipuladores, condições que aumentam a chance de contaminação por microrganismos patogênicos. A manipulação durante o processamento industrial, equipamentos e utensílios higienizados de forma incorreta, estão entre as principais fontes de contaminação e produtos cárneos. Com as práticas higiênicas inadequadas oriundos dos manipuladores, acresce a possibilidade dos mesmos serem portadores assintomáticos de enterobactérias, podendo levar a uma contaminação cruzada, comprometendo o produto e toda a área de processamento (GERMANO, GERMANO, 2008).

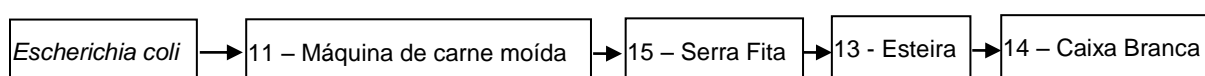
Os principais grupos de microrganismos indicadores de qualidade em produtos cárneos são: psicrotróficos, mesófilos, termófilos, bactérias anaeróbias, indicadores de contaminação fecal, como coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli*, família *Enterobacteriaceae*, enterococos e *Clostridium perfringens*. Além destes, destaca-se ainda *Staphylococcus aureus*, bactérias mesófilas produtoras de esporos, clostrídios sulfito redutores, bolores e leveduras, microrganismos halófilos, proteolíticos, lipolíticos e osmofílicos (SILVA, 2008). Conforme Tompkin (1983), a contagem total de microrganismos heterotróficos aeróbios ou facultativos mesófilos viáveis, de coliformes totais e *Escherichia coli* constituem-se indicadores comuns da determinação da qualidade de produtos cárneos.

A *E. coli* é a enterobactéria mais predominante na carne (FELIPE, 2008) e sua contaminação, geralmente inicia-se durante o abate, pelo contato da pele do animal impregnada com resíduos de fezes (JAY, 2005). A higiene inadequada de equipamentos, utensílios utilizados no processamento industrial, bem como as mãos dos manipuladores é um fator importante devido ao significativo aumento da contagem de microrganismos deteriorantes e patogênicos na maioria das amostras das carnes após a manipulação, encontrando-se impróprias para o consumo humano (OLIVEIRA et al., 2008).

Como observado no quadro 2, constatou-se através de sequenciamento, a presença de *Escherichia coli* em quatro pontos do processamento industrial, sendo no ponto 11 – máquina de carne moída, ponto 15 – serra fita, ponto 13 – esteira e

ponto 14 – caixa branca, como demonstrado na Figura 8. No principal ponto contaminado, carne moída tem uma superfície de contato maior e proveniente de retalhos de outras carnes faz com que ela seja uma ampla fonte de contaminação. Essa contaminação se dá, inclusive, por enterobactérias que podem causar distúrbios gastrointestinais agudos, como diarreia, vômito, desconforto e dores abdominais (OLIVEIRA; NASCIMENTO; FIORIN, 2002).

Figura 8 – Pontos amostrais com contaminação por *Escherichia coli* confirmada por sequenciamento

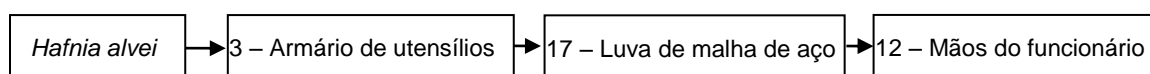


Fonte: Autoria própria.

A contaminação da máquina de carne moída pode advir da máquina serra fita, etapa anterior. A determinação de coliformes termotolerantes em mãos de funcionários, facas e serras fita, apresentaram resultados insatisfatórios, demonstrando a falta de higiene dos funcionários e na prática de higienização dos equipamentos. Embora a carne possa ser contaminada microbiologicamente antes de entrar em contato com o utensílios, segundo Ferreira e Simm (2012), tanto os moedores de carne quanto os demais utensílios e equipamentos de ambientes industriais são considerados potenciais fontes de contaminação, pois, na maioria das vezes, não passam por higienização na frequência e do modo adequado.

Como demonstrado na Figura 9, há a presença de *Hafnia alvei* no ponto amostral 17 – luva de malha de aço e no ponto amostral 12 – mãos de funcionário, comprovando que há contaminação cruzada no processamento industrial frigorífico em estudo. Este microrganismo ocorre nas fezes de humanos e animais, solo, água e produtos de origem animal (MURRAY, 2003). São patógenos oportunistas para o homem, usualmente no sangue, urina ou feridas infeccionadas em pacientes com estado de saúde debilitado ou imunodeprimidos (JANDA; ABBOTT, 2006).

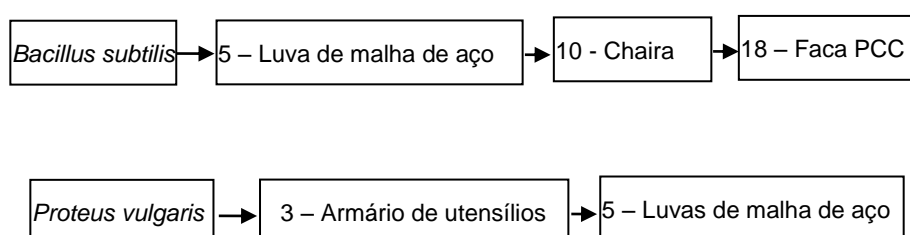
Figura 9 – Pontos amostrais com contaminação por *Hafnia alvei* confirmada por sequenciamento



Fonte: Autoria Própria, 2017.

A capacidade de alguns microrganismos formar biofilmes, tem sido associada com a sua persistência em ambientes produtivos, sendo considerada a principal causa de contaminação cruzada em produtos prontos (CARPENTIER; CERF, 2011). A capacidade de microrganismos formarem biofilme em superfícies é considerada o principal fator da contaminação cruzada dos produtos finais, pois uma vez contaminado, o utensílio contaminará, por consequência, todos os alimentos com os quais entrar em contato (CAMARGO; NERO; TODOROV, 2014). Comprovando esta informação sobre contaminação cruzada relacionada a este trabalho, a figura 10 demonstra a contaminação por *Bacillus subtilis* no ponto 10 – chaira e consequentemente, contaminação no ponto 18 – faca. Facas e chairas devem ser devidamente higienizados e esterilizados após o uso em cada carcaça. Apesar da prática de higienização ser adotada no estabelecimento avaliado, ainda foi possível isolar colônias típicas nesses utensílios, o que enfatiza a necessidade de maior controle.

Figura 10 – Contaminação cruzada de *Bacillus subtilis* e *Proteus vulgaris* relacionado com os pontos amostrais



Fonte: Autoria própria

A intervenção para a manipulação adequada de alimentos contribui para maximizar a segurança do manipulador no manuseio de alimentos, ampliar as perspectivas educacionais e fornecer à população um alimento seguro, do ponto de

vista microbiológico (LEVINGER, 2005). Uma maneira de desenvolver o manipulador é fazê-lo reconhecer microrganismos potencialmente veiculadores de doenças de origem alimentar, que atuam no hospedeiro humano e o que necessitaria fazer para oferecer alimentos seguros, do ponto de vista microbiológico (FINLAY; FALKOW, 1997).

Os resultados deste trabalho corroboram com a literatura (OLIVEIRA et al., 2008), comprova que as bactérias sequenciadas provenientes do ambiente produtivo do frigorífico bovino em estudo, são na maioria veiculados através das mãos de funcionários que manusearam produtos e/ou utensílios contaminados, contribuindo para a existência de contaminação cruzada no processo produtivo, demonstrando a necessidade que se atente ainda mais para treinamentos para a manipulação com segurança alimentar durante o processamento industrial.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foram diagnosticados 25 pontos críticos no controle de qualidade do processamento industrial de um frigorífico bovino, a partir de um diagrama decisório.

Na análise microbiológica, visando selecionar patogênicos produtores de biofilmes indesejáveis no processamento industrial, isolou-se enterobactérias de origem de conteúdo gastrointestinal bovino, estafilocócica de origem humana.

Para enterobactérias, nos 25 pontos amostrados, 10 pontos obtiveram resultado microbiológico positivo isolados no meio EMB. Para o meio SS, obteve-se 10 pontos com crescimento positivo. Para isolamento em meio MSA, dos pontos amostrados, 2 pontos obtiveram crescimento positivo. Evidenciando falhas na higiene dos equipamentos e utensílios, bem como contaminação cruzada oriunda pelo manipulador, confirmado a partir a identificação molecular.

A determinação do perfil genético dos microrganismos isolados foi realizada em 3 etapas, sendo a primeira a extração do DNA dos microrganismos isolados. A segunda etapa realizou a amplificação dos mesmos, com o envio para sequenciamento. A terceira etapa foi realizada com os resultados do sequenciamento, com a construção da árvore fenotípica para confirmação genotípica.

Com os resultados do sequenciamento, a identificação genotípica chegou a nível de espécie, sendo *Escherichia*, *Brevibacillus*, *Proteus*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Hafnia*, *Shigella* e *Providencia*. Relacionando os resultados com o fluxograma e os pontos amostrais, constatou-se a presença de contaminação cruzada no processo produtivo do frigorífico em estudo, com presença de *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e *Hafnia alvei*, sendo microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, com exceção de *Bacillus*, sendo a maioria dos pontos relacionadas com o manipulador. Isso demonstra a possível presença de biofilmes microbianos, o que propicia a propagação de microrganismos durante o processo produtivo no frigorífico.

Estes resultados evidenciam que há deficiência nos procedimentos e segurança alimentar advindo dos funcionários, demonstrando que há a necessidade de melhores treinamentos para os mesmos.

Para minimizar a contaminação oriunda do manipulador na empresa, obtendo melhorias no processamento industrial em relação microrganismos patógenos e deteriorantes, pode-se investir em treinamentos eficientes para os colaboradores, com certa periodicidade, evidenciando a importância da limpeza e sanitização correta de mãos, utensílios e equipamentos da empresa, descrevendo os perigos para a própria sanidade e com relação a contaminação de patógenos nos produtos finais, destinados ao consumidor final. Bem como manuais ou procedimentos padronizados fixados no interior da empresa, em local de fácil visualização dos colaboradores, para adequada esterilização e/ou sanitização de utensílios e equipamentos.

REFERÊNCIAS

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **ISO 22000**: Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos.
- AKKAYA, L.; CETINKAYA, Z.; ALISARLI, M.; TELLI, R.; GOK, V. The prevalence of *E. coli* O157/O157:H7, *L. monocytogenes* and *Salmonella spp.* on bovine carcasses in Turkey. **Journal of Muscle Foods**, n. 19, p. 420-429, 2008.
- ALVARENGA, T. H. P. **Cenário da gestão da qualidade nos laticínios de micro e pequeno porte da região dos Campos Gerais no Paraná**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2014.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2008.
- ANDRADE, N. J.; BRABES, K. C. da S. **Procedimentos de higienização e biofilmes microbianos na indústria de alimentos**. Viçosa: Tribuna, 2003
- ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996.
- ANVISA. Portaria nº 2914 de 12 dez. 2011. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de dez. 2011.
- ARAUJO, G. C.; PEREIRA, M. O.; SILVA, C. R.; SILVA, M. A. C.; VAZ, T. R. D. **Gestão da Qualidade da Agroindústria de Carne Bovina**. 48º Congresso SOBER – Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Campo Grande, 25 a 28 de julho de 2010.
- ARSLAN S; EYI A. Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. **Journal of Food Protection**. n. 73, p. 1613–1617. 2010.
- ASHFORD, D. A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULALIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER JR. R.H.; BADARÓ, R.; DAVID, J. R. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**, v. 53, p. 251-255, 1995.
- BERTOLINO, M. T. **Gerenciamento da qualidade na indústria alimentícia: ênfase na segurança dos alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

BEHLAU, I.; GILMORE, M. S. Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infections Disease. **Archives of Ophthalmology**, v. 126, n. 11, 1572-1581, 2010.

BERESFORD, M. A. R.; ANDREW, P. W.; SHAMA, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1000-1005, 2001.

BHUNIA, A. K., **Foodborne Microbial Pathogens**. New York: J. Wiley and Sons, p. 135-148, 2007.

BOLAND, T.; LATOUR, R. A.; STUTZENBERGER, F. J. Molecular Basis of Bacterial Adhesion. Totowa, NJ, **Humana Press**, n. 2, p. 29-41, 2000.

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

BOSILEVAC, J. M.; GUERINI, M. N.; KALCHAYANAND, N.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and characterization of *Salmonella* in commercial ground beef in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**. n. 75, p. 1892–1900. 2009.

BOWER, C. K.; McGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science Technology**, n.7, p. 152-157, 1996.

BRANDA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p 20-26, 2005.

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

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

BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de defesa Agropecuária - SDA. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal - DIPOA. Coordenação Geral de Programas Especiais - CGPE (Circular No 175/2005/CGPE/DIPOA, de 16 de maio de, 2005). Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. Brasília: Ministério da Agricultura, 39 p. 2005

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Circular nº 463, de 05 de agosto de 2014.

BRENNER, D.J. Introduction to the family Enterobacteriaceae, in the Prokaryotes. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W; SCHLEIFER, K.H. (Ed.). **A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria**. 2 ed. New York, 1992.

BUENO, M. P.; ARAUJO, G. C.; FRATA, A. M.; SRPOESSER, R. L.; SAUER, L. **Gestão da Qualidade nos Frigoríficos de Abate e Processamento de Frangos em Mato Grosso do Sul**. XLV Congresso da Sober. Londrina, Paraná, 2007.

CABEÇA, T. K. **Suscetibilidade de microrganismos relacionados com contaminação de alimentos em biofilme artificial e em suspensão frente desinfetantes**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Araraquara, 2006.

CAMARGO, A. C.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. Where the problem is with *Listeria monocytogenes*? **Journal of Nutritional Health & Food Engineering**, n. 1, n. 6, 2014.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premisses. **International Journal of Food Microbiology**, n. 145, p. 1-8, 2011.

CHEN, J.; ROSSMAN, M. L.; PAWAR, D. M. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. **LWT. Food Science and Technology**, Oxford, n. 40, p. 249-254, 2007.

CRAY JR, W. C.; MOON, H. C.; Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 1, p. 1586-1590, 1995.

CRIADO, M. T.; SUAREZ, B., FERREROS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, n. 48, p. 123-126, 1994.

CODEX ALIMENTARIUS. **Código de practicas para el pescado y los productos pesqueros**. 1 ed. Roma. OMS, 2009.

COMPAGNOL, P. C. B; PADILHA, A. D. G; SANTOS, B. A. Qualidade higiênico sanitária da carne bovina moída comercializada na cidade de Santa Maria, RS. **Higiene Alimentar**, 2009.

COSTERTON, J. W., STEWART, Philip S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

COSTERTON, J. W.; WILSON, M. Introducing biofilms. **Cambridge University Press**, v.1, p. 1-4, 2004.

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

DALY, K.; SHARP R. J.; McCARTHY, A. J. "Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulphate-reducing bacteria." **Microbiology**, v. 146, p. 1693-1705. 2000.

DENNE JUNIOR, W. M. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

DEVEREUX, R.; HINES, M. E.; STAHL, D. A. S.. "Cycling characterization of natural communities of sulfate-reducing bacteria by 16S rRNA sequence comparisons." **Microbial Ecology**, n. 32, p. 283-292. 1996.

DIAS, J.; HEREDIA, L.; UBARANA, F.; LOPES E. **Implementação de sistemas de qualidade e segurança dos alimentos**. 1. ed. Londrina, 2010.

DIAS, E. C.; BITTENCOURT, J. V. M.; KOVALESKI, J. L. **Importância do APPCC (HACCP) como ferramenta da qualidade no processamento de frango**. IV Congresso Brasileiro de Engenharia de Produção. Ponta Grossa, PR, Brasil, 03 a 05 de dezembro de 2014.

DIFCO; BBL MANUAL. **Manual of Microbiological Culture Media**. Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2003.

DUCAS, C. T. S.; SILVA, L. F. Pesquisa de *Salmonella* spp. e enumeração de coliformes totais e termotolerantes em carcaça de suínos abatidos em matadouro-frigorífico de Uberlândia, Minas Gerais. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.17. n.1, p. 54-61. 2011.

DUTRA, M. G. B. As múltiplas faces e desafios de uma profissão chamada medicina veterinária. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. Brasília. Ano 12, n; 37, p. 49-56. 2006.

ELDER, R.O.; KEEN, J.E.; SIRAGUSA, G.R.; BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; KOOHMARAIE, M.; LAEGREID, W.W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcass of beef cattle during processing. **Applied Biological Sciences**, v. 97, n. 7, p. 2999-3003, 2000.

FARMER, J. J. Enterobacteriaceae: introduction and identification, p. 636–653. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), **Manual of clinical microbiology**, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C. 2003.

FELIPE, L.M. **Associação de bactérias da família Enterobacteriaceae e Clostridium estertheticum com a deterioração “blown pack” em cortes cárneos embalados a vácuo**. 2008, 86f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP, Jaboticabal- SP, 2008.

FERREIRA, I.M. **Riscos relacionados à contaminação microbiana de carne moída bovina**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. 2008.

FERREIRA, R. S.; SIMM, E. M. Análise microbiológica da carne moída de um açougue da região central do município de Pará de Minas/MG. **Revista Digital FAPAM**, v. 3, n. 3, p. 37-61, 2012.

FIGUEIREDO, R.M. SSOP: Padrões e Procedimentos Operacionais de Sanitização; Programa de Redução de Patógenos; Manual de Procedimentos e Desenvolvimento. **Coleção Higiene dos Alimentos**, vol. 1. São Paulo. 1999.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Commons themes in microbial pathogenicity revisited. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 61, p.139-169, 1997.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. n. 8, p. 623-633. 2010.

FONSECA, C. F.; STAMFORD, T. L. M.; ANDRADE, S. A. C.; SOUZA, E. L.; SILVA, C. G. M. Práticas de trabalho higiênico-sanitárias e implementação de um plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP) nas indústrias de processamento de lagosta. **Food Science and Technology**, v. 33 n. 1, 2013.

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

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

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. São Paulo: Varela. Cap.12, p. 215-220. 2001.

GIESE, J. H. Sanitation: the key to food safety and public health. **Food Technology**, v. 45, n. 12, p. 74-80, 1991.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. São Paulo: Atlas, 1991.

GIORDANO, J. C. GALHARDI, M. G. **Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC**. 2 ed. Campinas. SBCTA. 2007.

GONÇALVES, D. **Caracterização molecular de isolados de Staphylococcus aureus e produção de marcadores genéticos para diagnóstico de mastite em bovinos leiteiros**. 2006. 137f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GRANUM, P. E.; DOYLE, M. P.; BEAUCHAT, L. R.; MONTIVILLE, T. J. Bacillus cereus. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2. ed., p. 373-381. 2001.

HAIMOVICH B, VENKATESA MM. Shiguella e Salmonella: death as a means of survival. **Microbes and Infection**. v. 8, n. 2, p. 568-577. 2006.

HILBERT, L. R.; BAGGE-RAVNB, D.; KOLDC, J.; GRAMB, L. Influence of surface roughness of stainless steel on microbial adhesion and corrosion resistance. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v. 52, n. 3, p. 175-185. 2003.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: **Bergey's Manual of determinative bacteriology**. 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus Hafnia: from Soup to Nuts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 12–18, 2006.

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

JENKINSON, H. F.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Biofilms adhere to stay. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 9-10, 2001.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOE, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 52, p. 123-127, 2006.

LANE, D. L. B.; PACE, G. J.; OLSEN, D. A.; STAHL, M. L.; SOGIN, N. R. **Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses**. Proceedings of National Academy of Science, v. 82, p. 6955-6959. 1985

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

LASA, I.; PENADES, J. R. Bap: a Family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 99-107, 2006.

LAZAROTTO, C. **Formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* isolado de cateter venoso central através de métodos fenotípicos e genéticos**. Porto Alegre, 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

LEVINGER, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. **Food Nutrition Bulletin**, v.26, p.170-178, 2005.

MAFU, A. A. ; PLUMETY, C. ; DESCHENES, L. ; GOULET, J.. Adhesion of pathogenic bacterial to food contact surfaces: Influence of pH of culture. **International Journal of Microbiology**, n. 2011, p. 1-10, 2010.

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

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agentes. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-38, 2001.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. **Journal General Microbiology**, v. 68, p. 337-348, 1971.

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

MITTELMAN, M. W. Structure functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. **Symposium Biofilms, Development and Control**. Canada, n. 81, p. 2760-2764, 1998.

MONTEIRO, F. C. **Avaliação de *Listeria monocytogenes* como controle de qualidade no processamento de carnes**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Produção. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2015.

MORENG, R. E.; AVENS, J. S. **Ciência e produção de aves**. Sao Paulo: Roca, p. 380. 1990.

MOREIRA, J.L.S.; MOTA, R.M.; HORTA, M.F.; TEIXEIRA, S.M.R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated

in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiology**. n. 5, p. 1-9. 2005.

MORITA, T.; KITAZAWA, H.; IIDA, T.; KAMATA S. Prevention of *Salmonella* cross-contamination in an oilmeal manufacturing plant. **Journal Of Applied Microbiology**, v; 101, n. 2, p. 464-473. 2005.

MUJICA, P. Y. C. Dinamica operacional da auditoria nas indústrias de pescado. **Simpósio de controle e qualidade do pescado**. Santos, Anais, Instituto de Pesca, p. 1-33. 2006.

MULLIS, K.B.; F.A. FALOONA. Recombinant DNA - Part F. In: **A polymerase catalyzed chain reaction**, p. 335-350. San Diego: Academic Press, 1987.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**, 8 ed. American Society for Microbiology, 2003.

NASCIMENTO, M. R. STAMFORD, T. L. M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Higiene Alimentar**. v. 14, n. 70, p. 32-35, 2000.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 2, 1998

NEIVA, I.F. “**Caracterização molecular de biosorotipos selvagens de streptococcus mutans isolados de crianças com diferentes históricos da doença cárie.**” Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos. Curitiba: UFPR, 2007.

NITSCHKE, M. **Biotensoativos como agentes inibidores da ação de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos.** Projeto de Pesquisa. EMBRAPA. CTAA, 2006.

OLIVEIRA, M. M. M; BRUGNERA, D. F; MENDONÇA, A. T; PICOLLI, R. H. Condições higiênico- sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 2008.

OLIVEIRA, N. D. M.; NASCIMENTO, L.C. D.; FIORINI, J. E. Isolamento e identificação de bactérias facultativas mesofílicas em carnes frescas Bovinas e Suínas. **Higiene alimentar**. São Paulo, v. 16, n. 94, p.101-105. 2002.

OLIVINDO, C.S.; CHAPAVAL L.; VILLARROEL, A.B.S.; ALVES, F.S.F.; SOUSA, F.G.C.; FERNANDES, F.E.P.F.; ALVES, F.S.F; SOUSA, F.G.C.; FERNANDES, F.E.P. Detecção de *Staphylococcus aureus* utilizando a técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p.1317-1321, 2009.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Disponível em <<http://www.who.int/eportuguese/pt/>>. Acesso em janeiro de 2017.

OUYANG, Y.; LI, J.; DONG, Y.; BLAKELY, L. V.; CAO, M. Genome-wide screening of genes required for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Biotech Research**, n. 4, p. 13-25, 2012.

PARIZZI, S. Q. F.; ANDRADE, N. J.; SILVA, C. A. S.; SOARES, N. F. F.; SILVA, E. A. M. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. **Brazilian Archives of Biology Technology**. Curitiba, v. 47, n.1, p. 77-83, 2004.

PAULUS, W. **Microbicides for the protection of materials: a handbook**. London: Chapman Hall, n. 496, p. 1993.

PENNEY, N.; HAGYARD, C.J.; BELL, R.G. Extension of shelf life of chilled sliced roast beef by carbon dioxide packaging. **International Journal of Food Science and Technology**, v.28, n.2, p. 181-91, 1993.

PEREIRA, T. L.; KOVALESKI, J. L. **Controle da carga microbiana em carne bovina através do uso de ácido peracético**. III CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO. Ponta Grossa, PR, Brasil, 04 a 06 de dezembro de 2013.

PERETTI, A. P. R., ARAUJO, W. M. C. Abrangencia do requisito segurança em certificados de qualidade de cadeia produtiva de alimentos no Brasil. **Gestão e Produção**, v. 17, n. 1, p. 35-49, 2010.

PIZZOLITTO, E. L.; PISSOLITTO, A. C.; POSETTI, G. L. Chemical and microbiological evaluation of the internal surfaces of aluminium tubes both online and

lined with epoxy resin by means of the stereoscope and scanning electron microscope. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 340-344, 2001.

PHILLIPS, P. L.; WOLCOTT, R. D.; FLETCHER, J.; SCHULTZ, G.S. Biofilms Made Easy. In: **Wounds International**, v. 1, n. 3, 2010.

QUEIROZ, A. T. A.; RODRIGUES, C. R.; ALVEZ, G. G.; KAKISAKA, L. T. Boas práticas de fabricação em restaurantes self- service a quilo. **Higiene alimentar**, v.14, n. 78, p. 45-49, 2000.

RASMUSSEN, M. A.; CRAY, W. C. Jr.; CASEY, T. A.; WHIPP, S. C. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 114, n. 1, p. 79-84, 1993.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA A.J.P. **Patologia aviária**. Manole: Barueri. p. 34-66. 2009.

RIBEIRO-FURTINI, L. L.; ABREU, L. R. Utilização do APPCC na indústria de alimentos. **Ciencia Agrotécnica**. v. 30, n. 2, p. 358-364, 2006.

RIEDEL, G. **Controle sanitário de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 2005.

ROÇA, R.O. Microbiologia da Carne. UNESP, Campus de Botucatu, 2004.
Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br/outros/tcarne/tecarne.htm#s5>>. Acessado em: 17 de junho de 2016.

ROCHA, C. F., VILELA, M. A. P., PINTO, C. L. O. Aspectos de higiene e métodos de avaliação de procedimentos de limpeza e sanificação na indústria de laticínios. **Revista do ILCT**, V.309, n.54, p. 197-204, 1999.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, n. 239, p. 487-491. 1988.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, n. 24, p.184-204, 1987.

SCOT D.E.; CALLAWAY T.R.; WOLCOTT R.D.; SUN Y.; MCKEEHAN T.; HAGEVOORT R.G.; EDRINGTON T.S. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. **BMC Microbiology**. v. 8, n. 1, p. 25-137. 2008.

SCHRAFT H.; KLEINLEIN, N.; UNTERMANN, F. Contamination of pig hindquarters with *Staphylococcus aureus*. **International Journal Food Microbiology**, Oxford, v.70, n.1/2, p.191-194, 1992.

SELENSKA, S.; KLINGMULLER, W. DNA recovery and direct detection of Tn5 sequences from soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 21-24. 1991.

SEUß, I. - Valor nutricional de la carne y de los productos cárnicos. Consideraciones críticas sobre sus componentes en comparación con otros alimentos. **Fleischwirtsch**, n. 1, p. 47-50. 1991.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2. ed. São Paulo, 2001.

SILVA, E. A. **Manual de controle higiênico sanitário em serviços de alimentação**. São Paulo: Varela, 2008.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, n. 56, 187-209, 2002.

STRINGARI, D. **Estudo da variabilidade genética de *Guinardia* spp por meio de marcadores RAPD e sequências ITS**. Dissertação de mestrado. Curitiba: UFPR. 94f. 2004.

SURESH T, HATHA AAM, SCREENIVASA D. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* and other salmonellas in the eggs and eggstoring trays from retails markets of Coimbatore, south India. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 294-299. 2006.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – na immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222-227. 2001.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR S. MEGA4: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis** (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.24, p.1596-1599, 2007. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>).

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

TERRA, C. O., MADRONA, G. S., SALVESTRO, A. C., SANTANA, G. A., MOURA, M. M., FIDELIS, J. C. Elaboração e Implantação de Procedimentos Operacionais Padrão no Setor de Laticínios. **Revista Tecnológica**, n. 19, p. 75-78. 2010.

TOBIAS, W.; PONSANO, E. H; G.; PINTO, M. F. Elaboração e implantação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle no processamento de leite pasteurizado tipo A. **Ciência. Rural**, v. 44, n.9. 2014.

TOLEDO, J. C. **Gestão da qualidade na agroindústria**. Gestão agroindustrial. 2. ed. São Paulo: Atlas, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: Improving the sensibility of progressive sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOMPKIN. Indicator organisms in meta and poultry products. **Food Technology**, v. 37, n. 6, p. 101-110, 1983.

TORNADIJO, M.E.; GARCÍA, M.C.; FRESNO, J.M.; CARBALLO, J. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simo'n cheese. **Food Microbiology**, n.18, p. 499–509, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE B. R.; CASE C. L. **Microbiologia**. Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. **Microbiologia**. 2. Ed. São Paulo, Atheneu. 398 p. 1999.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Journal of Science and Technology**, v. 25, p. 807-815. 2003.

TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**. 2. ed. San Diego: Academic Press. 478p. 1993.

VALCARCE, M. B.; BUSALMEN, S. R.; SANCHES, R. The influence of the surface condition on the adhesion of *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 17552) to copper and aluminium brass. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 50, p. 61-66, 2002.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LUPSKI, J. R. 16S ribosomal DNA amplification for 521 phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, n. 173, p. 697-703, 1991.

WELLS S. J., FEDORKA-CRAY P. J., DARGARTZ D. A. Faecal shedding of *Salmonella* spp. By dairy cows on farm and at cull cow markets. **Journal of Food Protection**; v. 64, n. 1, p. 3-11. 2001.

WIRTANEN, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

XAVIER, J. B.; PICIOREANU, C.; ALMEIDA, J. S.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Biomatemática - Boletim de Biotecnologia**. Universidad Nova de Lisboa, 2002.

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilmes formation: a new problem for the food industry? **Food Technology**, v. 48, n. 7, p. 107-114, 1994.

ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, n. 23, p. 125-148, 1994.

APÊNDICE A - Questionário de pesquisa realizado com a coordenadora da qualidade do frigorífico bovino em estudo para levantamento dos programas de controle de qualidade utilizados.



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Produção

Pesquisa sobre Controle de Qualidade em Indústria de Produtos Cárneos

Pesquisadores: Cláudia Walus

Esta pesquisa está sendo desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção da UTFPR-PG, com o intuito de identificar e avaliar os Programas e Ferramentas da Qualidade, presentes no ambiente industrial de produtos cárneos.

Comprometemo-nos em manter a identificação de sua empresa em sigilo e as informações cedidas serão utilizadas somente para fim científico.

INFORMAÇÕES PRELIMINARES

Empresa: _____

Cargo/Função: _____

Formação: _____

Data: ____/____/____

QUESTIONÁRIO

1. Liste os principais produtos que a empresa apresenta no processo produtivo?

2. Assinale os programas ou ferramentas de qualidade, utilizadas na presente empresa.

- () Boas Práticas de Fabricação - BPF
 () Análise de Pontos Críticos de Controle – APPCC
 () ISO 9000 – Gestão da Qualidade
 () Procedimento Padrão de Higiene Operacional – PPHO
 () Monitoramento de Pragas – MIP
 () Controle Estatístico de Processo – CEP
 () Folha de Verificação – FV
 () Outras:

3. Com os programas ou ferramentas da qualidade implementadas na empresa, já foi notado:

() Algum problema no processo produtivo. Qual? _____

() Alguma chance de melhoria no processo produtivo.

Qual? _____

() Algum problema no produto final.

Qual? _____

() Outros: _____

4. Os programas ou ferramentas são geralmente implementadas na empresa para:

() Sanar problemas

() Otimizar processo

() Melhorar de produto

() Reduzir perdas

() Aumentar competitividade

() Atender a legislação

() Outras: _____

5. A empresa possui um responsável pela coordenação da qualidade?

() Sim () Não

Se SIM, quem é o responsável? Qual a sua formação? _____

6. Como é realizada a avaliação da eficácia das ferramentas e programas para controle de qualidade?

() Análises Microbiológicas

() Análises Físico-Químicas

() Análises Sensoriais

() Satisfação do Cliente – Serviço de Atendimento do Consumidor – SAC

() Resultados de Vendas do Produto

() Outros: _____

7. A empresa realiza análises microbiológicas na matéria prima e/ou no produto final?

() Sim () Não

Se SIM, a análise é interna ou com parcerias? _____

Com que periodicidade? () Diária () Semanal () Mensal

Se NÃO, explique o motivo _____

8. A empresa realiza análises físico-químicas na matéria prima e/ou no produto final?

() Sim () Não

Se SIM, a análise é interna ou com parcerias? _____

Com que periodicidade? () Diária () Semanal () Mensal

Se NÃO, explique o motivo. _____

9. A empresa realiza análises sensoriais na matéria prima e/ou no produto final?

() Sim () Não

Se SIM, a análise é interna ou com parcerias? _____

Com que periodicidade? () Diária () Semanal () Mensal

Se NÃO, explique o motivo. _____