

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

**Eficiência do TIMSEN® nas etapas de escaldagem e pré-resfriamento em
abatedouro de aves**

Valmor Lansini

Pelotas, 2010

VALMOR LANSINI

**EFICIÊNCIA DO TIMSEN® NAS ETAPAS DE ESCALDAGEM E PRÉ-
RESFRIAMENTO EM ABATEDOURO DE AVES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2010

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

.....
Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra

.....
Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas

A Simone, à Luíze e Ariane
Por tudo que representam na minha vida

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo.

Aos meus pais pela vida, pelo amor, pelo exemplo de família, em especial a minha mãe que de longe está vigiando por mim.

A minha esposa e filhas, pela paciência e incentivo, imprescindíveis para que eu continuasse meus estudos.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

Ao meu orientador Prof. Wladimir Padilha da Silva, pelos ensinamentos, confiança, incentivo e, acima de tudo, pela grande amizade e parceria, juntamente com toda sua família.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, que fazem a excelência desta casa, pelo apoio ao meu crescimento pessoal profissional, pelas palavras de incentivo que sempre vieram na hora certa. Um agradecimento especial ao Professor Pedro *“in memorian”*, por ter sido meu primeiro professor nesta etapa de aprendizagem que Deus o tenha.

À Secretaria da Agricultura Pecuária Pesca e Agronegócio de Estado do Rio Grande do Sul, por permitir que profissionais do seu quadro se qualifiquem a fim de melhorar os serviços prestados.

À querida amiga e colega de mestrado Denise Prates pessoa fundamental neste processo pela força, empenho, dedicação, trabalho ensinamentos, paciência, parceria, carinho e companheirismo, muito obrigado DÊ.

Ao amigo e colega Rodrigo França, pela força, parceria, dedicação e auxílio.

A colega e amiga Maria Cristina, estagiária pela força e compreensão.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia, por todo o apoio, carinho, por compartilharem comigo os momentos de entusiasmo e de desânimo, com os quais me defrontei nesse período.

Aos estabelecimentos de abate de aves que nos permitiram de forma espontânea, e se colocaram a disposição para contribuir com nosso trabalho, pois sem eles não seria possível à realização desta pesquisa.

Ao Colega e amigo Dr. Cezar Bado, por através de a empresa Sanphar proporcionar a realização deste trabalho, e também pela colaboração.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

LANSINI, Valmor. **Eficiência do TIMSEN® nas etapas de escaldagem e pré-resfriamento em abatedouros de aves.** 2010. 99f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A cadeia de produção de frangos de corte é bastante complexa, e quando comparada com as cadeias das outras espécies de animais domésticos, possui um ciclo muito mais curto para obtenção do alimento final (carne de frango e seus derivados), os quais como qualquer produto de origem animal, podem ser veículos de agentes causadores de Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA). Todas as etapas de uma cadeia de produção são importantes para obtenção de um alimento seguro, mas algumas delas, pela sua natureza e complexidade, exigem cuidados maiores e especiais, pois podem comprometer o produto de forma definitiva não sendo mais possível diminuir os riscos em etapas seguintes dentro do processamento. Com este trabalho objetivou-se avaliar a eficiência do sanitizante TIMSEN® (N-alquil dimetil benzil amônio 40% - Uréia estabilizada 60%), quando adicionado na água de escaldagem e de pré-resfriamento de frangos em abatedouros com inspeção oficial no sul do Rio Grande do Sul. Foram amostradas a água de escaldagem e de pré-resfriamento, bem como carcaças de frangos, tanto após a escalda quanto após o resfriamento, avaliando-se a presença de *Listeria monocytogenes*, a enumeração de Coliformes termotolerantes e a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios. Verificou-se que o produto TIMSEN® foi eficiente, tanto na água de escaldagem quanto na água de pré-resfriamento, no controle de *L. monocytogenes*, bem como foi efetivo na redução de coliformes termotolerantes e de microrganismos mesófilos aeróbios.

Palavras-chave: Antimicrobianos, abate de aves, *L. monocytogenes*.

Abstract

LANSINI, Valmor. **Eficiência do TIMSEN® nas etapas de escaldagem e pré-resfriamento em abatedouros de aves**. 2010. 99f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Broiler production chain is very complex, and when compared with the chain of other domestic animals it has a much shorter cycle for obtainment of the final product (chicken meat and its derivatives), which like any other product from animal origin can be carrier of Foodbourne disease (FBD) causing agents. All stages of a production chain are important to obtain safe food, but some of them, due to their nature and complexity, need special care as they can compromise the product in a definite way, making it impossible to control the risks in the subsequent steps within the processing stages. The aim of this work was to evaluate the efficiency of TIMSEN® sanitizer (N-alkyl dimethyl benzyl ammonium 40% - Stabilized Urea 60%) when added to scalding and pre-chilling water in a poultry abattoir with official inspection in the South of Rio Grande do Sul. Scalding and pre-chilling water, as well as broiler carcasses after scalding and after chilling were sampled for evaluating the presence of *Listeria monocytogenes*, thermotolerant coliforms and for counting aerobic mesophilic microorganisms. TIMSEN® was efficient in the *L. monocytogenes* control when added to the scalding as well as pre-chilling water. It was also effective in the reduction of thermotolerant coliforms and aerobic mesophilic microorganisms.

Key-Words: Antimicrobial. Poutry's Slaughter. *L. monocytógenes*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Quadro pontos potenciais de contaminação cruzada no processamento de aves.....	21
Figura 2	Visão geral de um galpão de criação no momento da captura.....	23
Figura 3	Condições de transporte e acondicionamento das aves.....	25
Figura 4	Sacrifício das aves (sangria)	26
Figura 5	Processo de escaldagem por imersão em aves.....	28
Figura 6	Processo de depenagem.....	30
Figura 7	Visão das etapas da evisceração.....	32
Figura 8	Lavagem das carcaças com jatos de água direcionados.....	33
Figura 9	Processo de pré-resfriamento em <i>chillers</i>	38
Figura 10	Embalagem e classificação por partes, cortes e acondicionamento.	41
Figura 11	Cortes de frango.....	42
Figura 12	Embalagem de frangos e cortes.....	43
Figura 13	Configuração estrutural do TIMSEN®.....	51
Figura 14	Representação da diminuição da tensão superficial da água.....	52
Figura 15	Setores onde o produto TIMSEN® tem sua utilização.....	53
Figura 16	Representação esquemática das linhas de abate de aves dos abatedouros estudados localizadas no sul do Rio Grande do Sul..	56
Figura 17	A) água com 200ppm de TIMSEN®; B) ausência do produto na água.	59
Figura 18	Processo de coleta da água de escaldagem.....	59
Figura 19	A) identificação dos frangos; B) identificação das carcaças.....	60
Figura 20	Processo de amostragem e acondicionamento das amostras.....	60
Figura 21	A) Placa de Petri com crescimento de colônias típicas de coliformes; B) Tubos com produção de gás (1), positivos para coliformes, e sem produção (2), negativo para coliformes.....	63
Figura 22	Esquema demonstrando as etapas de isolamento de <i>Listeria</i> spp..	64

Figura 23	Contagens de microrganismos mesófilos aeróbios em água de escaldagem em 4 coletas em três abatedouros de aves no sul do Rio Grande do Sul.....	70
Figura 24	Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios na água de pré-resfriamento (<i>chiller</i>) antes e após a adição de TIMSEN® em três abatedouros de aves localizados no sul do Rio Grande do Sul.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características empregadas para a confirmação e identificação das espécies de <i>Listeria</i> isoladas neste trabalho (adaptado de Holt et al., 1994).....	66
Tabela 2	Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios em água de escaldagem de frangos, antes e após a adição de TIMSEN [®] ,	68
Tabela 3	Contagem de mesófilos aeróbios em água de pré-resfriamento de frangos, antes e após a adição de TIMSEN [®] ,	71
Tabela 4	Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios em carcaças de frango nas etapas de escaldagem e de pré-resfriamento (<i>chiller</i>), antes e após a adição de TIMSEN [®]	73
Tabela 5	Contagem de coliformes termotolerantes em 3 abatedouros de aves no sul do Rio Grande do Sul.....	76
Tabela 6	Demonstra os pontos amostrados onde houve ocorrência de <i>Listeria</i>	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Etapas do processamento nas quais pode existir contaminação	22
2.1.1 Granja.....	22
2.1.2 Transporte	25
2.1.3 Sacrifício.....	26
2.1.4 Escaldagem.....	27
2.1.5 Depenagem.....	30
2.1.6 Evisceração.....	31
2.1.7 Lavagem das carcaças.....	33
2.1.8 Resfriamento	37
2.1.9 Classificação e maturação	40
2.1.10 Produtos	41
2.1.11 Embalagem	42
2.1.12 Distribuição.....	43
2.2 Caracterização dos microrganismos avaliados	44
2.2.1 Coliformes	44
2.2.2 Listeria monocytogenes.....	45
2.3 Sistema APPCC	48
2.4 Caracterização do produto TIMSEN® - N – Alquil dimetil benzil amônia clorado (40%)	51
2.4.1 Estrutura da molécula.....	51
2.4.2 Mecanismo de ação	51
2.4.2 Ação tensoativa do produto.....	52
2.4.3 Indicações de uso do produto	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	55

3.1 Estabelecimentos estudados	55
3.2 Processo de amostragem.....	58
3.2.1 Água e matéria-prima	58
3.2.1.1 Análises microbiológicas da água	61
3.2.1.1.1 Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios.....	61
3.2.1.2 Análises microbiológicas dos frangos.....	62
3.2.1.2.1 Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios.....	62
3.2.1.2.2 Contagem de coliformes termotolerantes.....	62
3.3 Isolamento e identificação de espécies de Listeria	63
3.3.1 Isolamento de colônias presuntivas de <i>Listeria</i> spp.	63
a) Enriquecimento seletivo primário	63
b) Enriquecimento seletivo diferencial.....	64
c) Isolamento de colônias características.....	64
d) Subcultivo das colônias características.....	65
e) Confirmação e identificação de <i>Listeria</i> em nível de espécie.....	65
 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 68
4.1 Efeito do TIMSEN® na água da escaldagem e do pré-resfriamento	68
4.2 Efeito do TIMSEN® sobre microrganismos mesófilos aeróbios nas amostras de frangos	72
4.3 Efeito do TIMSEN® sobre coliformes termotolerantes nas amostras de frangos.....	75
4.4 Efeito do TIMSEN® sobre <i>Listeria</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i> nas amostras de frangos.....	77
 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 821
 6 CONCLUSÕES	 812
 REFERÊNCIAS.....	 83
 ANEXOS	 97

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial e o primeiro exportador mundial de carne de aves, tendo uma receita cambial de U\$ 4.203 bilhões (ABEF, 2006). O país utiliza modernas técnicas em toda cadeia produtiva, entre as quais se destaca o manejo durante a criação, nutrição e controle sanitário. Dispõe, também, de um moderno parque industrial para efetuar o abate e processamento dos produtos avícolas, sendo a maioria dos frigoríficos habilitados para exportar carne de aves e seus derivados para os mais exigentes mercados internacionais.

Entre os aspectos que envolvem a produção e a transformação desses produtos, e que merecem cuidados especiais, estão aqueles relativos aos aspectos higiênico-sanitários. Muitos são os microrganismos que podem provocar contaminações em carne de aves, podendo causar enfermidades em humanos.

Desde a década de 60, vem sendo utilizada uma ferramenta de qualidade, conceituada como Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP), ou, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Conforme Stevenson (1995), o APPCC é um sistema de segurança alimentar que atua no controle de qualidade de um processo produtivo que age na prevenção de não-conformidades e nos pontos críticos de controle. De acordo com o mesmo autor, o sistema APPCC tem por objetivo identificar perigos relacionados com a saúde dos consumidores e que podem ser gerenciados e monitorados nos diversos segmentos de produção através de métodos de controle estatístico de processos.

O sistema APPCC baseia-se em uma série de etapas inter-relacionadas, inerentes ao processamento industrial de alimentos, que inclui todas as operações, desde a produção primária até o consumo do alimento. Tem como base a identificação dos perigos potenciais para a segurança do alimento e as medidas preventivas para controlar as situações que criam os perigos.

Esta ferramenta de segurança alimentar passou a ser uma exigência para que os países conseguissem exportar os seus produtos alimentícios. Por isso, a partir de 1998 a indústria de alimentos brasileira, mais especificamente as indústrias de produtos de origem animal tem, no APPCC, seu principal programa de qualidade, isto se deu após edição da Portaria n.º 46 de 10 de fevereiro de 1998, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Para conseguirem o máximo de qualidade na produção de alimentos, as indústrias mudaram progressivamente seu foco de atenção, que estava baseado na qualidade do produto e que significava somente qualidade no produto final. Atualmente a preocupação volta-se à qualidade no processo, que enfatiza o controle de cada ponto crítico na produção.

Cabe salientar que esta consciência ainda está limitada a grandes empresas e principalmente as que alcançaram os promissores mercados externos onde a maior parte das exigências é feita por estes mercados compradores, e possibilitados pelos retornos financeiros que estas exportações proporcionam. Já aqueles estabelecimentos de menor porte, que abatem e industrializam para os mercados internos, principalmente os regionais e locais, e que ainda não tem em suas inspeções, tanto as estaduais quanto as municipais, suas legislações regulamentadas que obrigam estas empresas a implantarem os programas de autocontroles como Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, padecem no que se refere à qualidade final dos produtos.

Os pontos críticos de controle (PCC) são definidos após análise de risco do fluxograma de cada produto. Um ponto crítico de controle existente em matadouros-frigoríficos é a temperatura das carcaças na saída do resfriamento, já que a partir daí, o produto poderá ter três destinos: o consumidor final, estocagem ou processamento. Embora o processo dê certa garantia de qualidade microbiológica, este não garante a inocuidade ou ausência de microrganismos nestes produtos, e o binômio tempo e temperatura serão decisivos para a durabilidade e consequente inocuidade dos produtos.

Para que os frangos saiam do resfriamento com uma temperatura de aproximadamente 7°C, há necessidade de equipamentos e processos além de equipe treinada para atingir tal objetivo, o que muitas vezes não é possível em pequenos estabelecimentos, onde os frangos saem do resfriamento com a temperatura acima do ideal, necessitando que seja complementado o processo em

câmaras frias, para atingir a temperatura ideal e evitar assim o desenvolvimento rápido de microrganismos. É nestas situações que se justifica o uso de alternativas para redução da carga inicial de microrganismos, a fim de que no final do processo de resfriamento tenha-se um produto com qualidade.

Sempre que há um desvio no limite estabelecido para o PCC, deve ser realizada uma ação corretiva visando a eliminação, prevenção ou minimização do perigo, para que a população não corra risco de consumir alimentos contaminados por microrganismos patogênicos. Na indústria de aves, uma das possíveis ações corretivas quando as carcaças de frango saem do resfriamento com temperaturas acima dos limites definidos, é a sua permanência em câmaras de resfriamento até atingirem a temperatura ideal.

A verificação de um PCC, bem como a definição de seus limites tem como base o conhecimento técnico-científico ou, quando o mesmo não existe disponível, a indústria deve certificar que a partir do limite estabelecido o alimento é seguro.

O limite para a temperatura das carcaças ao saírem do pré-resfriamento é de 7°C, que é aceita como aquela que cessa a multiplicação da maioria das bactérias responsáveis por enfermidades transmitidas por alimentos, como *Escherichia coli*, *Estafilococos* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens*. Exceção para *Listeria monocytogenes*, que continua se multiplicando em temperaturas de resfriamento. Este limite é, inclusive, definido por lei, através da Portaria 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1998).

Uma alternativa que seria tecnicamente possível e que é cientificamente comprovada e utilizada em muitos países para diminuir os riscos de transmissão de doenças veiculadas por alimentos, é a diminuição da carga inicial de microrganismos durante o processo de abate, onde se encaixa a adição de antimicrobianos seguros nas águas de escalda e de resfriamento dos frangos.

TIMSEN[®] é um antimicrobiano e possui um amplo espectro de ação é fungicida, viricida, bactericida e algicida, é ativo na presença de matéria orgânica, e na presença de “água dura” até 550ppm, atua numa ampla faixa de pH (ativo em pH 3 a 11), possui seu pH neutro, possui ação em biofilmes pelo seu poder de penetração, é altamente estável, apresenta-se sob a forma de cristais solúveis em água (alta e baixa temperatura), possui efeito tenso ativo: reduz a tensão superficial da água, possui efeito residual prolongado (10 a 14 dias), não é corrosivo e não é irritante, é biodegradável e não polui o meio ambiente. Poucos produtos possuem

todas estas características, portando trata-se de um produto com características diferenciadas.

Frente ao exposto, este trabalho foi desenvolvido visando contemplar os seguintes objetivos:

- a) avaliar a qualidade microbiológica da água de escaldagem, em três plantas frigoríficas de abate de aves, antes e após a adição do produto TIMSEN[®] (N-alquil dimetil benzil amônio 40% - Uréia estabilizada 60%);
- b) avaliar qualidade microbiológica da água de pré-resfriamento em três plantas frigoríficas de abate de aves, antes e após a adição do produto TIMSEN[®];
- c) avaliar a ação do TIMSEN[®] na água de escaldagem e de pré-resfriamento sobre carcaças de frangos, com relação à presença de *Listeria monocytogenes* e redução de coliformes termotolerantes e de microrganismos mesófilos aeróbios.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais e líder em exportações de carne de frango. O setor avícola brasileiro cresce, ocasionando avanços na economia, gerando empregos e movimentando bilhões de reais. A boa qualidade dos produtos, o esforço do setor para ampliar os mercados consumidores, a disponibilidade da produção de grãos, além do aumento, a cada ano, da produção brasileira demonstram que o país possui um potencial muito grande para a produção de carne de frango (SCHORR, 2002; ABEF, 2006).

Por tais razões, a sanidade da avicultura brasileira merece especial atenção para que o seu padrão de qualidade não seja prejudicado. A intensificação da produção contribui para a produtividade e eficiência da indústria avícola, porém, como consequência, aumenta o risco de disseminação das doenças infecciosas e a necessidade de um maior controle da qualidade dos produtos (GAMA, 2004).

A segurança e a qualidade dos alimentos são questões de grande preocupação em produtos avícolas, pois a carne de aves pode conter diversos patógenos responsáveis pela transmissão de doenças alimentares. As alterações nos padrões de qualidade sanitária dos alimentos significam barreiras não tarifárias que ocasionam prejuízos, aduzindo-se a isto os gastos no diagnóstico de doenças e o desperdício de proteína de origem animal. Atualmente, os esforços do setor avícola em garantir produtos de alta qualidade contribuem para a manutenção do produto nacional em nível aceitável nas negociações internacionais, inclusive por mercados consumidores extremamente exigentes (DELAZARI, 2003; QUEVEDO, 2005).

No Brasil, a cadeia produtiva da carne de frango é uma das mais importantes da agropecuária. Nesta cadeia, podem ser incluídos todos os itens do sistema de produção, processamento, mercado atacadista e varejista, ou seja, além das granjas de produção, a genética, a nutrição, a sanidade, os equipamentos, a assistência técnica, os laboratórios de diagnóstico, as cooperativas de crédito, as

plantas de abate e processamento, os sistemas de transporte e comercialização, demonstrando que a avicultura de corte de porte empresarial é importante para a geração de renda, emprego e divisas no país (FIGUEIREDO, 2008).

O abate é um conjunto seqüencial de operações no qual algumas etapas são importantíssimas quanto à contaminação microbiana que poderá afetar o produto final. No quadro 1 e no esquema 2 são apresentados o fluxograma das operações de abate com seus pontos críticos de controle, os quais, se não forem adequadamente controlados na planta processadora, podem causar injúria ao consumidor final.

As aves encaminhadas ao abate normalmente são a fonte inicial de contaminação, e o número de microrganismos presentes nas aves pode ser influenciado pelas condições higiênicas de abate e processamento. A carne de frango está freqüentemente relacionada com a origem de enfermidades veiculadas por alimentos, sendo a *Salmonella* spp. um dos patógenos mais importante (HAFEZ, 2005).

A temperatura é o fator externo que mais afeta o crescimento microbiano. Em geral, quanto mais elevada for a temperatura, maior será a velocidade do crescimento. O tempo de conservação da carcaça de frango depende da temperatura e das condições microbiológicas da carne. A temperatura da ave viva é de cerca de 41°C, assim, pouco calor é perdido durante o processo de abate. No resfriamento, as carcaças são imersas em tanques contendo água em fluxo contra corrente, com objetivo de lavar e resfriar as carcaças. As operações de resfriamento envolvem o *pré-chiller* e *chiller*. Conforme o Centro de Tecnologia da Carne (1995), as carcaças de frango devem ser resfriadas rapidamente para diminuir o crescimento de microrganismos deterioradores e prevenir a multiplicação dos microrganismos patogênicos. A Portaria 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998b) estabelece os critérios técnicos da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária da carne de aves. Esta estabelece que a vazão de água dos tanques de resfriamento (*chillers*) deve ser monitorada, calculando-se 1 a 2 litros/carcaça. A temperatura da água, outro fator importante, deve ser inferior a 16°C na entrada, e inferior a 4°C na saída, a fim de que a temperatura das carcaças seja igual ou inferior a 7°C no final do processo.

Existe uma inquietação do segmento avícola em relação à pressão dos consumidores em relação à qualidade de industrialização dos seus produtos quanto

à presença de microrganismos de interesse em saúde pública. As indústrias de produtos cárneos, como frangos inteiros e cortes, desenvolvem medidas de prevenção na criação e dentro dos matadouros. Apesar da diminuição da ocorrência de problemas de infecções e intoxicações alimentares e a despeito das diversas medidas tomadas, não se eliminou totalmente o risco para o consumidor.

Os microrganismos necessitam de água, nutrientes e condições apropriadas de temperatura e pH para se multiplicarem. Durante a produção, processamento, embalagem, transporte e armazenamento, qualquer alimento pode ser exposto à contaminação por substância tóxica ou por microrganismos. Falhas de processamento podem permitir a sobrevivência de tais microrganismos ou a manutenção de toxinas. Um exemplo está na falha do controle de temperatura de resfriamento de carcaças de frango *in natura*.

Segundo Franco e Landgraf (2002), microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos, sobre a deterioração potencial do alimento, ou indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, a produção ou o armazenamento.

Os microrganismos e/ou seus produtos metabólicos, em determinadas quantidades, são indicadores da qualidade do alimento e estão diretamente relacionados com o prazo de validade dos mesmos, o que nos permite fazer uma avaliação da qualidade e durabilidade dos alimentos cumprindo os seguintes critérios: devem estar presentes e ser detectados em todos os alimentos cuja qualidade deve-se avaliar; sua multiplicação e seu número devem ter uma relação direta negativa com a qualidade do alimento; devem ser detectados e contados facilmente e diferenciados dos outros microrganismos; seu crescimento não deve ser obstaculizado por outros componentes da microbiota do alimento; terem associação constante com o patógeno que deve indicar; não existirem em alimentos que estão isentos do patógeno, exceto em quantidade mínimas (JAY, 2005).

Os perigos microbiológicos podem surgir e isso comumente acontece por erros nas técnicas de manipulação e processamento. A detecção destes erros, suas correções imediatas e a prevenção futura são o maior objetivo de qualquer sistema de controle microbiológico (GIOVA, 1997).

A pesquisa de coliformes a 45°C nos alimentos fornece, com maior segurança que a de coliformes totais, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação eventual da presença de enteropatógenos. Em alimentos, a presença de um número considerável de coliformes indica um produto de baixa qualidade, equipamentos/utensílios sujos ou manipulação sem cuidados de higiene. Outros indicadores, como estafilococos, em número elevado no alimento, são uma indicação de perigo potencial à saúde pública devido a possível presença de enterotoxina estafilocócica, bem como de uma sanificação questionável, principalmente quando o processo de produção envolve manipulação do alimento. Já *Clostridium* spp., que são formadores de esporos, podem permanecer nos alimentos quando a maioria dos microrganismos entéricos forem destruídos. Além disso, *Clostridium perfringens* e o *C. botulinum* são importantes patógenos causadores de toxinfecções de origem alimentar (FRANCO; LANDGRAF, 2002; OLIVEIRA et al., 2003).

O quadro 1 procura demonstrar quais são os pontos possíveis de contaminação cruzada em uma planta processadora de aves, nas suas mais

variadas etapas desde a granja até a distribuição, chamando atenção para algumas etapas onde há maior probabilidade de contaminação.

Figura 1: Quadro com pontos potenciais de contaminação cruzada no processamento de aves.

ETAPA	PONTOS DE CONTAMINAÇÃO CRUZADA
Granja	Localização da granja, ventilação, abastecimento da água, tipo de material do piso, umidade da cama, pó, ar, ave a ave, roedores, insetos e mascotes.
Transporte	Ave a ave, penas, caixas de carga, equipamento de captura, pó e ar
Recepção e pendura	Ave a ave nas caixas, ar na área de espera, caixas, mãos dos penduradores, ar e pó na área de pendura, ganchos e pó no trilho
Sangria	Ave a ave, máquina de sacrifício ou faca, água do tanque de insensibilização, ganchos e pó na esteira
Escaldagem	Água do tanque de escalda, ave a ave, vapor, ar, ganchos e pó no trilho
Depenagem	Ave a ave, dedos de borracha, vapor, ar, cortadores de jarretes, esteira transportadora ao pendurador, mãos dos revisores, mãos dos operadores do pendurador, ganchos e pó no trilho
Evisceração	Mãos dos empregados e dos inspetores, facas e instrumentos de corte, superfícies (aspiradores de pulmões, cortadores de cabeças, etc.); ar, ave a ave, instrumentos não cortantes (o extrator de pulmões, arrancador de cabeças, etc.); esteiras transportadoras e carcaças, carcaças de vísceras comestíveis e água, estantes de pendura de dorso, ganchos e pó no trilho.
Resfriamento	Resfriamento por imersão; água do tanque, gelo, ave a ave, elevadores, esteiras e canais, víscera a víscera, pescoço a pescoço, pás ou parafusos sem fim; resfriamento por ar; ar, ave a ave,
Classificação	Mãos dos empregados, esteiras, ganchos e pó no trilho, ave a ave, ar.
Embalagem e gelo	Mãos dos empregados, caixas de embalagem, ave a ave, ar, gelo, material de embalagem, vísceras ou pescoço a carcaça
Cortes	Mãos dos empregados, serras ou facas, ave a ave, corte a corte, esteiras, bandejas, ganchos e pó no trilho.

Quando as instalações não podem manter um ambiente limpo e o produto se adultera, a maioria dos serviços de inspeção exige que se descarte o produto de forma adequada para ser tratado com intervenções antimicrobianas, ou então que se condene e depois seja destruído. Por exemplo, nos Estados Unidos, os processadores que seguem preparando e vendendo ou transportando os produtos condenados podem ser criminalmente processados sob a Lei de Inspeção de Produtos Avícolas (HOUSTON, 1985). Assim como no Brasil a legislação é extremamente rigorosa neste sentido, ou seja, se der aproveitamento diferente do recomendado pela Inspeção Sanitária, o indivíduo e as empresas serão responsabilizados civil e criminalmente por crime contra saúde pública (BRASIL, 1952).

2.1 Etapas do processamento nas quais pode existir contaminação

2.1.1 Granja

Depois da planta de incubação, os pintos são colocados em galpões de dimensões variadas, que podem conter de 5 mil, 15 mil e mais de 20 mil frangos (produtores médios e grandes). Na granja, os frangos são criados até 6 ou 9 semanas de idade, ou quando chegam a 1,5 a 4,0Kg de peso vivo (Sams, 1994). Muitas práticas no manejo anteriores à captura podem afetar a contaminação durante o processamento. As fontes de contaminação estão presentes em todo o processo da produção avícola. Na granja, as fontes de contaminação podem ser o lote de reprodutoras, a água contaminada, os insetos, os roedores e os pássaros (WALTMAN, 2000).



Figura 2 - Visão geral de um galpão de criação no momento da captura.

Na granja, os frangos estão expostos à contaminação devido à localização (se está perto ou longe da fontes de contaminação), granjas vizinhas, instalações (idade da edificação, dimensões, teto), tipo de ventilação (natural ou ventiladores laterais ou de teto), temperatura, abastecimento da água (público, de poço ou clorada), tipo de material do piso (cimento ou piso de terra), e materiais da cama, tipo de bebedouro (nipple, pratos, presença de saídas), aves (número, origem, linhagem genética, sexo), presença de roedores, insetos e mascotes nas instalações. Finalmente, e talvez sendo o elemento mais importante, o manejo da cama (OPARA et al. 1992; MAIO, 1974; MALLISON, 1990; BIRD, 1999; LILLARD, 1989; BAILEY et al., 1987).

Os microrganismos estão presentes externamente nas superfícies das patas, penas e pele, em associação com cama, pó, matérias fecais aderidas. Internamente, as bactérias estão presentes geralmente no trato intestinal e no sistema respiratório (BAILEY et al., 1987).

Outro importante fator na disseminação de patógenos é a cama do aviário, que é uma cobertura de aproximadamente 5 cm disposta sobre o piso do galpão, que utiliza materiais como raspas ou serragem de pinho, eucalipto, madeira de lei, casca de arroz, sabugo de milho ou palha, podendo ser renovada a cada ciclo de produção ou reutilizada a cada quatro a seis lotes de frango, com cada lote possuindo uma duração entre 40 a 50 dias (OLIVEIRA et al., 2003). A cama assume

a dupla função, de piso e de biodigestor dos dejetos. Desta forma, absorve a umidade, dilui o material fecal, isola os animais do piso e atua como colchão protetor. No entanto, a umidade da cama, independente do tipo de material, é o principal fator determinante para o aumento da proliferação microbiana (McWARD; TAYLOR, 2000). Assim, o equilíbrio dinâmico dos microrganismos depende da sua capacidade de adaptação ao meio, o que vai determinar sua maior ou menor competitividade. Entretanto, na cama de aviário, pode ser encontrado o equivalente à microbiota bacteriana intestinal das aves, acrescido de patógenos eventuais (KWAK; HUH; McCASKEY, 2005). Nesse sentido, com o intuito de controlar a disseminação de patógenos na cadeia produtiva de frangos, o Ministério da Agricultura estabeleceu um Programa de Sanidade Avícola – PNSA (BRASIL, 1994), o qual preconiza, num primeiro momento, o isolamento de *Salmonella* a partir de swabs cloacais e de arrasto sobre a cama de aviário.

As bactérias psicrotróficas isoladas de aves vivas nas plantas de processamento pertencem primariamente aos gêneros *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Achromobacter* e *Corynebacterium*, no entanto, o isolamento de *Pseudomonas* spp. é menos freqüente (BAILEY et al., 1987).

Antes de carregar as aves nas caixas de transporte, uma das intervenções mais efetivas que se pode aplicar na granja, é a implementação adequada do “jejum de alimento” de 8 a 10 horas antes do sacrifício, incluindo os períodos de transporte e de espera na planta. O jejum de alimento permite a eliminação adequada do alimento do trato intestinal (SAMS, 1994). No entanto, deve-se oferecer água constantemente para evitar a desidratação e a perda do peso corporal e de carcaça. O objetivo deste processo é reduzir a contaminação durante a retirada das vísceras, considerando-se a presença de menor material fecal no trato intestinal. O processo deve ser equilibrado, porque extensos períodos de jejum de alimento resultam em fezes líquidas, o que aumenta a contaminação cruzada no processamento. Demonstrou-se que a aplicação obrigatória do jejum de alimento antes do sacrifício aumentou de forma marcante e significativa a incidência de *Campylobacter* e de *Salmonella* no trato digestivo dos frangos em idade de abate. Observou-se um aumento de duas a três vezes na incidência de *Campylobacter* depois de jejum de alimento de 5 horas ou mais, enquanto se constataram reduções de *Campylobacter* quando foi feito abastecimento de água para beber com ácido láctico durante o período de jejum de alimento (BYRD et al., 2002).

2.1.2 Transporte

O transporte da granja até a planta do processamento leva geralmente de uma a cinco horas. Em geral recomendam-se esses tempos, porque abaixo disso exigiria tempo de jejum maior na granja, enquanto que acima de cinco horas resultam em estresse das aves (estresse pelo calor no verão e pelo frio no inverno) (SAMS,1994). Demonstrou-se que os níveis de contaminação aumentam durante o transporte devido ao contato extremo entre as aves, e entre as aves e as caixas que estiveram em contato com outros lotes contaminados. O transporte pode levar à contaminação e estudos com lotes não infectados demonstraram que as caixas são fontes de *Salmonella* spp. (RIGBY et al., 1980). Quando os frangos chegam à planta, as caixas são mecanicamente descarregadas a esteiras transportadoras para entrar na planta de processamento. A captura, o transporte e a descarga podem causar defeitos da carcaça, como hematomas, desarticulações e ossos quebrados.



Figura 3 - Condições de transporte e acondicionamento das aves.

2.1.3 Sacrifício

O desenho das plantas de processamento deve permitir sua completa e adequada limpeza para melhorar segurança e reduzir os riscos de contaminação (HOUSTON, 1985). Uma limpeza inadequada pode resultar na contaminação do lote processado no dia seguinte. Em um estudo realizado com um lote contaminado com *Campylobacter jejuni* e com outro não contaminado, notou-se que os lotes contaminados contaminaram os equipamentos de tal maneira que o lote processado no dia seguinte, originalmente livre de *C. jejuni*, foi contaminado também (GENIGEORGIS et al., 1986).

Outro estudo determinou que a contaminação do ar e o movimento dos trabalhadores tem um papel importante na contaminação de carcaças (RAHKIO et al., 1997).

É difícil melhorar a qualidade microbiológica dos frangos de corte. Para reduzir o nível de patógenos de forma significativa, em vez de eliminar os patógenos na planta, devem-se entregar frangos livres de patógenos (BAILEY, 1993).

Depois de entrar na planta de processamento através do transportador, os frangos são manualmente pendurados pelas patas em ganchos de um trilho. Depois da pendura, as aves são atordoadas por um choque elétrico, submergindo-lhes a cabeça numa solução salina carregada, com 20-40mA e 30-60V AC para que a ave perca a consciência antes da sangria (SAMS, 1994).



Figura 4 - Sacrifício das aves (sangria).

A máquina de sacrifício consiste de uma lâmina rotatória circular que corta as veias jugulares e as artérias carótidas do pescoço. Esta etapa também pode ser realizada de forma manual com auxílio de facas específicas para tal. Depois da etapa de sacrifício os frangos permanecem pendurados nos trilhos para que sangrem por cerca de três minutos antes de entrar no tanque de escaldagem.

Os números de bactérias são significativamente mais altos quando os frangos entram na planta, portanto, a contaminação cruzada durante o processamento normal, e como reduzi-la, são temas importantes para os processadores de aves e consumidores. Os frangos vivos entram nas plantas de abate muito contaminados. Suas bactérias podem aderir às superfícies dos equipamentos, contaminar a água de processamento e disseminar-se para outras aves durante o processamento (Houston, 1985). Na planta, o transporte, a manipulação e a contaminação cruzada em cada etapa do processamento, incluindo pendura, escaldagem, evisceração, e resfriamento, podem influir sobre o nível de contaminação do produto final (Lillard, 1989). Estudos já demonstraram que equipamentos, mãos dos trabalhadores da linha de produção e nas amostras de ar da planta de processamento, aparentemente, a contaminação tinha uma origem intestinal (Oosteron et al., 1982).

A qualidade da água também é uma grande preocupação em operações avícolas, já que esta se utiliza na maioria das etapas do processamento.

2.1.4 Escaldagem

Durante a escaldagem (Figura 5), se submergem os frangos em tanques de água quente para soltar as penas, e esse processo elimina parte da carga bacteriana, dependendo da intensidade do processo. Realiza-se o escaldo chamado “duro” (sub-escaldagem) a 55-60°C por 45 segundos, o que remove as xantofilas (pigmentos) da pele e os frangos tende a ter uma cor pálida e esbranquiçada. As altas temperaturas são mais prejudiciais porém mais efetivas em relação à eliminação bacteriana, em comparação com o processo alternativo chamado escaldagem “branda”.

Um fato relevante, é a contaminação cruzada que pode ocorrer no tanque de água da escalda, já que todas as aves entram em contato com essa água, cujas

temperaturas permitem o crescimento de determinados microrganismos. O desenho do tanque deve permitir que a água entre continuamente (HOUSTON, 1985). É de se esperar que a água estivesse contaminada, entretanto, a recontagem de aeróbios totais da água do escaldado raramente excede $5 \log \cdot \text{mL}^{-1}$ (WALKER; AYRES, 1956). Depois de um incremento inicial, a contagem bacteriana na água do escaldado permanece constante durante o dia. O processo de escaldagem apresenta o problema de que a maioria das aves fica manchada com material fecal nas penas e todas essas fontes se combinam no tanque.

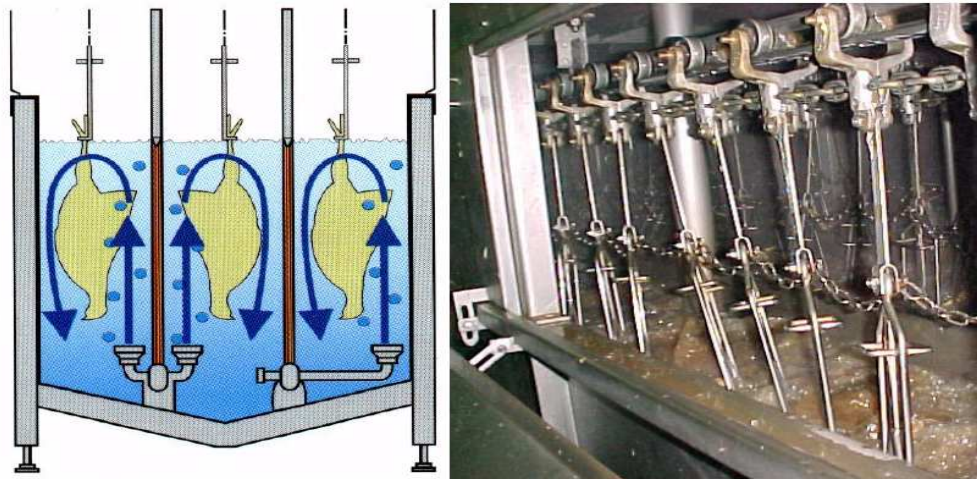


Figura 5 - Processo de escaldagem por imersão em aves.

Apesar das superfícies externas das aves sacrificadas estarem muito contaminadas antes do escaldado, o fluxo contínuo da água e a introdução de água limpa, e quente, além da destruição de algumas bactérias pelo calor, evitam a acumulação excessiva de bactérias num tanque de escaldado comercial (BAILEY et al., 1987). Outros esforços para diminuir esses inconvenientes, incluem banhar e escovar os frangos antes do escaldado e o uso de modelos com três tanques, que diminuem a contaminação nos tanques seguintes. A escalda e o resfriamento são etapas do processo nas quais pode ocorrer à contaminação cruzada entre carcaças, mas a escalda geralmente diminui os níveis de microrganismos devido às altas temperaturas (GADNER; GOLAN, 1976).

A principal objeção a escalda por imersão é a possibilidade de contaminação cruzada por patógenos. É importante o controle frequente de *C. perfringens* em aves

depois do escaldo (LILLARD, 1971; BAILEY et al., 1987) e de *Staphylococcus* spp. na água e nas aves (WALKER; AYRES, 1956). Contudo, raramente se isola *Salmonella* spp. em amostras de água da escalda (BAILEY et al., 1987).

A escalda tem um papel relativamente menor na deterioração das carcaças de frangos. Bactérias psicrotróficas estão presentes nas patas, penas e pele de aves vivas, incluindo principalmente *Acinetobacter* spp, *Corynebacterium* spp e *Flavobacterium* spp. Os números desses microrganismos geralmente se reduzem depois da escalda (BAILEY et al., 1987). Além disso, normalmente não se encontram *Pseudomonas* spp, que é a principal bactéria que causa a deterioração das aves evisceradas, na ave viva, nem no trato intestinal e, por isso, raramente aparece na água do escaldo.

Tem sido considerado que o escaldo “duro” possa ser responsável pela redução da vida útil dos produtos finais, o que parece estar relacionado com as mudanças epidérmicas e com a remoção da capa de cutícula que ocorre em temperaturas acima de 58°C. Por outro lado, o escaldo a 52°C não retira a cutícula e está associado a uma vida útil mais prolongada dos produtos. Aparentemente, a pele sem cutícula é levemente desnaturada nas carcaças de frangos submetidas ao escaldo “duro”, sendo um substrato mais adequado para os microrganismos deteriorantes, como *Pseudomonas* spp. provenientes da água e do gelo (BAILEY et al., 1987).

Outros métodos de escalda são o *spray* de vapor de água quente e escaldadores do tipo *batch* que usam vapor sub-atmosférico. Discute-se se as temperaturas do escaldo altas ou baixas trazem os melhores resultados. A alta temperatura pode eliminar algumas bactérias, incluindo patógenos, mas cria melhores condições para a contaminação posterior por bactérias psicrotróficas, podendo reduzir a vida útil dos produtos. Por outro lado, a baixa temperatura do escaldo não é tão efetiva para reduzir os patógenos e exige mais tempo para se chegar a resultados significativos (BAILEY et al., 1987). Usam-se ambos os métodos indistintamente e o maior efeito de outras etapas do processamento minimiza os efeitos do escaldo.

2.1.5 Depenagem

Faz-se a depenagem passando as carcaças por linhas de “dedos de borracha” giratórios que retiram as penas e ajudam a eliminar o sangue residual. As depenadoras mecânicas e outros aparelhos que são usados no processamento devem ser desenhados de forma a garantir a higiene (HOUSTON,1985). Essa aparelhagem representa outra fonte de contaminação cruzada, considerando-se que tem sido demonstrado que microrganismos como *Salmonella* spp., aderem-se firmemente na pele das aves (LILLARD, 1989; DEMING et al., 1987) e os dedos de borracha atuam como transmissores da contaminação.



Figura 6 - Processo de depenagem.

Encontraram-se baixas contagens de bactérias depois da depenagem e da lavagem, porém, nas lavagens seguintes, o número de bactérias aumentou (MAY, 1974). As contagens de microrganismos aeróbios totais geralmente situam-se entre 1-3 log. cm⁻² depois da depenagem, mas na maioria das plantas de processamento encontraram-se contagens mais altas do que depois que as aves saíram do tanque de escaldagem (BAILEY et al., 1987).

2.1.6 Evisceração

Antes da evisceração retiram-se as patas. O objetivo da evisceração é retirar as vísceras não comestíveis em três etapas. Na primeira se abre a cavidade abdominal, (Figura 7), na outra se retiram as vísceras (pulmões e tratos gastrointestinais e reprodutor) e, na última, se recolhem as vísceras comestíveis (miúdos) (coração, fígado, moela). Além disso, na maioria dos países se faz inspeção post-mortem nesse ponto para retirar aves enfermas ou com contaminação fecal da linha, considerando-as como produtos “condenados”, as quais não podem seguir o processamento. Normalmente a contaminação fecal nem sempre é motivo para confisco, mas se exige que as carcaças sejam processadas nas unidades de lavagem e de recorte, um processo conhecido como reprocesso fora de linha. Em qualquer etapa do processo, incluindo a evisceração, no qual se manipulem as carcaças ou que estas se toquem ou toquem o equipamento, há possibilidade de contaminação (MAY, 1974; BAILEY et al., 1987).

As contagens bacterianas, que geralmente são baixas antes da evisceração, aumentam durante a remoção de vísceras (SÁNCHEZ et al., 2002). Demonstrou-se que a contaminação das esteiras transportadoras e do equipamento, durante a evisceração, aumenta ao longo do dia e representa um maior risco para as aves processadas mais tarde (BAILEY et al., 1987). Contudo, a lavagem por *spray*, combinada com a esfrega dos dedos flexíveis e a passagem de água, reduz a carga microbiana na pele dos frangos (BAYLEY et al., 1987). O uso de 40ppm de água clorada durante a lavagem depois da evisceração reduz o número de bactérias viáveis, e concentrações mais altas de cloro (70ppm) eliminam quase que totalmente as bactérias (THOMPSON et al., 1984). Nos EUA estão aprovados níveis de até 50ppm de cloro para descontaminar aves. Contudo, na Europa, não se podem usar soluções de cloro devido às preocupações com a possível formação de compostos de trihalometano. Outro estudo comparou cargas microbianas de carcaças de frango que foram aprovadas pela inspeção, ou que foram condenadas por contaminação fecal depois da lavagem com *spray* por 5 segundos com 200mL de água, não encontrando diferenças significativas (BLANKENSHIP et al., 1975).



Figura 7 - Etapas da evisceração.

As principais bactérias patogênicas transmitidas por produtos avícolas são *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (DEMING et al., 1987) que são provenientes do trato digestivo e são disseminadas pela contaminação cruzada de uma ave a outra durante a evisceração (HARRIS et al., 1986). Relatos de trabalhos de pesquisa descrevem que 1% a 15% das aves contaminam-se com patógenos, entre eles *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. durante o curso normal do processamento.

Considera-se a evisceração como uma significativa fonte de contaminação cruzada. Quando o intestino se rompe por força mecânica, o material extravasa e pode contaminar outras carcaças da linha. O conteúdo intestinal das aves que serão processadas contém até 7 log de *C. jejuni* por grama de amostra, e os números de *C. jejuni* nas carcaças aumentam depois da evisceração (OOSTERON et al., 1982).

Pode-se realizar a evisceração manualmente usando luvas. Embora seja trabalhoso, o risco de ruptura dos intestinos é menor, dependendo da experiência dos trabalhadores. Também se pode realizar automaticamente, o que é mais comum nas plantas de processamento devido à sua velocidade e uniformidade. Neste caso, utilizam-se três máquinas sucessivas nas três etapas da evisceração, poupando tempo e reduzindo o trabalho. Contudo, o risco da ruptura dos intestinos aumenta e, por consequência, a probabilidade de contaminação cruzada. Como *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. estão presentes nas fezes das aves (DEMING et al., 1987), a remoção e o recolhimento das vísceras podem ser momentos do processamento nos quais se transferem bactérias do intestino à pele. Estas etapas do processamento geralmente estão associadas a níveis microbianos mais altos ao se compararem às outras etapas que são imediatamente anteriores à da evisceração (IZAT et al., 1988).

2.1.7 Lavagem das carcaças

Um campo de avanço significativo da indústria avícola nos últimos cinco anos tem sido a incorporação das intervenções antimicrobianas aplicadas diretamente à superfície da carcaça mediante duchas, *spray* ou soluções de imersão contendo produtos químicos antimicrobianos. A aplicação em cabines ou lavadoras (Figura 8), para lavagem interna e externa é comum hoje em dia na maioria das plantas de processamento, e tem-se atribuído reduções significativas de contaminação a alguns destes produtos.



Figura 8 - Lavagem das carcaças com jatos de água direcionados.

Os veículos mais comuns de transmissão de *Salmonella* spp. e de *Campylobacter* spp. em aves e outros produtos de carne são as carcaças que sofreram contaminação cruzada a partir do conteúdo intestinal durante a evisceração (COX et al.,1981). Esses dois microrganismos são provenientes do trato digestivo de aves e se disseminam por contaminação cruzada.

Em resposta às exigências dos consumidores e a implementação de regras oficiais para a produção de produtos de carne mais seguros sanitariamente, tem-se realizado inúmeros estudos testando possíveis intervenções antimicrobianas, especialmente nos últimos 10 anos. O Conselho de Ciência e Tecnologia Agrícola (Council for Agricultural Science and Technology - CAST) publicou, em janeiro de 2004, uma ampla revisão das intervenções estratégicas para a segurança microbiológica dos produtos de carne. Além disso, desenvolveu-se uma grande variedade de enfoques para limpar produtos de carnes depois do sacrifício

(recentemente revisada por Mermelstein, 2001; Huffman, 2002; White, 2002; Conner 2001) que incluem enxágues com água fria e quente; pasteurização por vapor ou tratamento com vapor ao vácuo; recortes; diversas lavagens químicas, como cloro/dióxido de cloro, água ozonizada ou eletrolisada, fosfato trisódico ou sulfato de cálcio acidificado (ACS); lavagens com ácidos orgânicos (por exemplo: láctico, acético) com ou sem surfactantes; e radiação com raios gama ou radiação eletrônica.

Como foi descrito anteriormente, o processamento tem sido responsabilizado como a principal fonte de contaminação cruzada por *Salmonella spp* e *C. jejuni* nas carcaças de frangos. Diversos métodos de descontaminação química de carcaças têm sido testados e relatados na literatura.

Spray de água, com e sem bactericidas, têm sido investigados em várias combinações de pressão, temperatura e concentração para a descontaminação de superfície de carcaças (Cox et al., 1974) relataram uma redução de 1 log na contagem total de bactérias na superfície da pele do peito dos frangos de carcaças submergidas em água a 60°C por 1 min, de 2 log com água a 71°C e de 0,5 log com água a menos de 60°C. As carcaças submergidas em água a 60°C ou mais apresentaram aparência parcialmente cozida, afetando as qualidades sensoriais do produto. Em um estudo posterior, Morrison e Fleet (1985) verificaram que carcaças submergidas em água a 60°C (sem tratamento) por 10 minutos reduziram em 100 vezes a contaminação por *Salmonella spp.*. Além disso, com a incorporação de 200ppm de cloro ou 2,5% de sorbato de potássio na água de imersão a 60°C, observaram-se reduções significativamente mais altas que somente com água. Os autores relatam que alguns dos efeitos se deveram aos efeitos mecânicos do *spray* na remoção das bactérias e não das propriedades antimicrobianas das substâncias químicas (DEVLIEGHERE et al., 2004).

Os agentes antimicrobianos devem ser atóxicos e ativos sob condições rotineiras de processamento para reduzir significativamente o número de microrganismos, e as substâncias mais comumente utilizadas são cloro, dióxido de cloro, cloreto de sódio acidificado, água eletrolisada, ozônio, fosfato trissódico (TSP) e cloreto de cetilpiridino (CPC). Este último tem sido avaliado em vários estudos (MEATNQWS, 2004; RANSOM et al., 2003; POHLMAN et al., 2002 a,b; BREEN et al., 1997), citados por Sánchez-Plata (2007), avaliaram a ação do CPC e verificaram que esse composto é efetivo na redução de patógenos. Geralmente aplicam-se os

antimicrobianos “gasosos” (cloro, dióxido de cloro, ozônio e cloreto de sódio acidificado, que gera um oxi-halogênio) como solução aquosa, resultando numa redução de 2-4 log de patógenos, dependendo da concentração, temperatura de aplicação e tempo de contato. Os efeitos tendem a ser transitórios, não apresentando ação bactericida ou bacteriostática depois do tratamento. A razão primária é que esses compostos reagem prontamente com enlaces insaturados, sendo rapidamente removidos da solução, cessando, dessa forma, sua ação contra as células bacterianas. Conforme Sanches - Plata (2007 apud).

Tratamentos com ácidos orgânicos reduzem significativamente a contaminação cruzada na pele dos frangos. DUBAL et al., 2004; MARSHAL, 2003). Cox et al. (1974a), citados por Sánchez-Plata (2007), avaliaram a ação dos ácidos orgânicos e descrevem uma redução média de 1,21 log nas contagens bacterianas na pele da coxa de frangos imersa em solução de ácido succínico 5% a 60°C por 3 minutos. Já a pele tratada com ácido succínico 5% a 24°C por 3 minutos apresentou uma redução média de 0,78 log. Verificaram que o ácido láctico (1%) e o peróxido de hidrogênio (5%) diminuíram em 4 log a contagem de *Salmonella* spp. em carcaças inoculadas experimentalmente ou naturalmente infetadas com *Salmonella*. Bautista et al. (1997) demonstraram que o ácido láctico e uma mistura comercial de fosfato reduziram as contagens bacterianas nas carcaças de perus.

O ácido láctico é particularmente interessante porque seu mecanismo de inibição tem sido objeto de muito estudo, tem uma ampla especificidade, e é considerado como GRAS (Generally Recognized As Safe - Geralmente Reconhecido Como Seguro). Também tem sido demonstrado que as fórmulas com fosfatos reduzem a deterioração e o ranço das carcaças de frangos. Bautista et al. (1997) descrevem que o fosfato trissódico é um bactericida efetivo e que está aprovado para o uso no processamento de aves desde 1992. Hoje está se avaliando uma nova geração de antimicrobianos, como os produtos de polilisina e ácido láurico.

Enquanto muitos dos tratamentos relatados têm sido efetivos para diminuir a contaminação bacteriana, vários utilizam imersão em água quente ou em ácidos orgânicos, causando descoloração e deterioração da carcaça. É importante ressaltar que alguns ácidos orgânicos não são GRAS e, portanto, não podem ser utilizados comercialmente. Por conseguinte, exceto pela adição de cloro nos tanques de imersão de resfriamento e a ducha de carcaças (processo que se torna ineficiente na presença de grande quantidade de matéria orgânica), não há um único método

de descontaminação que seja predominantemente utilizado no processamento de aves.

A combinação de dois ou mais tratamentos de intervenção antimicrobiana em doses mais baixas pode atuar de forma sinérgica. Atacando frentes múltiplas, pode-se efetivamente reduzir os patógenos, mas se mantém a qualidade do alimento usando tratamentos individuais mínimos (NAM; AHN, 2003; SAMELIS et al., 2002; SOMMERS, 2002; HUFFMAN, 2002), citados por Sánchez-Plata (2007), Combinações de intervenções (por exemplo: tratamento com ácidos orgânicos e água quente ou vapor) podem não somente aumentar a eficácia, mas também servem para diminuir o impacto negativo na qualidade dos produtos de carne, resultando em produtos mais estáveis.

Outro exemplo é o sulfato de cálcio acidificado (ACS) (vendido por Mionix Corp., Roseville, CA sob a marca "Safe20". Alguns estudos demonstram que é muito eficaz como agente de lavagem das carcaças de gado e de aves (HUFFMAN, 2002; DICKENS et al., 2002) assim como agente de enxágue de carnes com considerável ação no controle de *L. monocytogenes*, podendo tanto matar, quanto inibir o crescimento desse microrganismo (KEETON et al., 2004). Segundo os fabricantes, esse produto inativa as bombas de prótons da membrana das bactérias, tendo assim um mecanismo de ação diferente dos ácidos orgânicos, como o láctico. O uso potencial destes tratamentos como parte de um enfoque múltiplo ainda necessita ser investigado.

Para garantir o uso adequado destes compostos na prática industrial, é necessário ter conhecimento quantitativo de sua atividade antimicrobiana (DEVLIEGHERE et al., 2004). Essa quantificação exige o uso do conceito de concentração inibitória mínima (CIM), citados por Sánchez-Plata (2007), que realizou este estudo.

As intervenções antimicrobianas aplicadas durante o processamento de produtos avícolas reduzem significativamente a prevalência e a carga de microrganismos patogênicos como *Salmonella spp.* e *Campylobacter jejuni* nas carcaças das aves. Contudo, há poucos estudos que tenham investigado o uso combinado das intervenções antimicrobianas avaliadas anteriormente. A combinação de diferentes intervenções antimicrobianas sob o conceito de obstáculos aumenta a possibilidade de inativar patógenos bacterianos mais eficientemente. Os efeitos de determinado método podem ser complementados por

um segundo tratamento, maximizando a inativação microbiana geral. O potencial desenvolvimento de resistência dos microrganismos por uma determinada intervenção também se minimiza quando é aplicado um conjunto de tratamentos, ao invés de um único tipo por vez. Além disso, os mecanismos de inativação de uma determinada intervenção antimicrobiana podem ser diferentes de outra e, portanto, se espera que as aplicações combinadas aumentem a inativação desses microrganismos, por afetá-los de formas distintas.

2.1.8 Resfriamento

Considera-se o processo de resfriamento como uma das etapas mais críticas do processamento de aves. Seu propósito principal é diminuir a temperatura da carcaça para inibir o crescimento bacteriano e, assim, maximizar a segurança alimentar e a vida útil do produto final. Os Estados Unidos exigem que se reduza a temperatura das carcaças dos frangos a 4,4°C ou menos, em 4 horas para carcaças de menos de 1,82 kg de peso; 6 horas para carcaças de 1,82 a 3,63 Kg de peso e 8 horas para carcaças de mais de 3,63 Kg (USDA, 1973; HOUSTON, 1985).

No Brasil exige-se que os frangos saiam do pré-resfriamento com temperatura máxima de 7°C, quando para mercado interno e de 4°C, quando para mercado externo. Portaria N.º 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Antigamente, se usavam *chillers* de imersão contínua. Nesse processo as carcaças e a água fluem na mesma direção, com 1,89L de deságue por carcaça. Vários autores demonstraram que a contagem microbiana total na pele das carcaças reduziu-se, inclusive depois do acúmulo de microrganismos na água do *chiller* ao longo do dia (KNOOP et al, 1971; BAILEY et al, 1987; MAY, 1974). Já outros investigadores observaram que o resfriamento por imersão contínua pode estar relacionado a um aumento da contagem microbiana na carcaça (LILLARD, 1971; BAILEY et al., 1987).



Figura 9 - Processo de pré-resfriamento em *chillers*.

Entre os fatores que contribuem para o aumento da contagem microbiana nas carcaças dos frangos resfriadas por imersão, está a contaminação bacteriana das carcaças antes do resfriamento, a quantidade de deságue e a substituição de água por carcaça, além da proporção entre as carcaças e a água (BAILEY et al, 1987).

Atualmente se usam dois métodos básicos para o resfriamento das carcaças: o resfriamento por imersão (IC), e o resfriamento por ar. Durante o IC, se submergem as carcaças que foram submetidas à lavagem final depois da evisceração em tanques com água fria com fluxo em contra corrente à direção das carcaças. Quando a carcaça sai do *chiller*, fica em contato com a água mais limpa e fria possível. Os *chillers* são geralmente grandes tanques com espirais ou pás que movem as carcaças para adiante na linha. As carcaças vão numa direção, enquanto a água vai em direção contrária.

A adição de cloro à água de resfriamento representa uma diferença significativa quando se compara o processamento nos EUA com a Europa. O uso de

cloro não é permitido na Europa devido às preocupações com a saúde, mas são usadas comumente nos EUA. A cloração melhora significativamente a limpeza das plantas de processamento (BAILEY et al., 1987). Observou-se que 40-60ppm de cloro na lavadora de carcaças tipo *spray* reduziram a contagem microbiana em comparação com a água comum (SANDERS; BLACKSHEAR, 1971). O resfriamento por duas horas em água com 10 a 20ppm de cloro aumentou significativamente a vida útil do produto (ZIEGLER; STADELMAN, 1955). O uso do cloro durante o resfriamento por imersão também foi efetivo contra patógenos importantes, como *Salmonella* Typhimurium, quando se utilizaram carcaças artificialmente inoculadas (BAILEY et al, 1987).

Todo o processo de resfriamento é projetado para reduzir a temperatura da carcaça a fim de inibir o crescimento de microrganismos, especialmente os patogênicos, que exigem temperaturas superiores a 25°C para se multiplicar. Embora o resfriamento não seja concebido para a limpeza das carcaças, sabe-se que o número de bactérias nas carcaças se reduz e a sua vida útil aumenta após essa etapa.

O resfriamento por imersão pode aumentar a retenção de água de 6-12%, contudo, além de atuar como etapa de enxágue, o cloro pode reduzir os níveis de bactérias deteriorantes e de patogênicas. No entanto, pelo contato entre carcaças pode haver disseminação de patógenos no *chiller*, aumentando a contaminação cruzada. James et al. (1992), por exemplo, avaliando uma planta de processamento de aves em Porto Rico, verificaram que a carga bacteriana foi reduzida no resfriamento por imersão, mas a incidência de *Salmonella* spp., aumentou depois do resfriamento.

Tradicionalmente, nos EUA, as carcaças de aves são resfriadas em água fria e depois embaladas e armazenadas em condições de alta umidade (ICMSF,1996). Alguns processadores preferem combinar ambos os processos para resfriar seus produtos. Geralmente se faz a imersão antes. Alguns produtos Kosher caracterizam-se por combinar os dois processos e por adicionar uma etapa de salga ao produto para aumentar a inibição bacteriana. A salga funciona reduzindo a atividade da água (A_w), que torna o ambiente adverso para o crescimento microbiano.

Estudos mais antigos, comparando o resfriamento por ar com o resfriamento por imersão, indicaram que a deterioração ocorre antes em carcaças submetidas ao resfriamento por imersão (KNOOP et al.,1971). Estes estudos demonstraram que os

microrganismos psicotróficos predominavam depois do resfriamento por imersão, levando à deterioração de carcaças antes que as resfriadas por ar, o que também foi relatado por Sanchez et al. (2002). Outros pesquisadores sugeriram um resfriamento por ar ou por *spray* como solução higiênica para os problemas da imersão (GROSSKLAUS; LESSING, 1964; BAILEY et al., 1987). Essas diferenças podem se dever à limpeza do *chiller* de imersão, ao aumento da manipulação das carcaças resfriadas por ar e diferenças entre processos de resfriamento por ar. As condições em que se realizaram os estudos também podem influenciar os resultados. Alguns estudos foram realizados em ambiente controlado de laboratório, enquanto outros foram realizados em plantas comerciais de processamento.

Estudos têm demonstrado resultados variáveis quanto à avaliação do *chiller* de imersão como ponto de contaminação na planta de processamento. Alguns estudos relataram aumento da prevalência de *Salmonella* spp. durante o resfriamento por imersão (JAMES et al., 1992; SÁNCHEZ et al., 2002), enquanto outros (CASON et al., 1997), não encontraram alterações na prevalência desse microrganismo, mas observaram redução de *Campylobacter*. A National Microbial Baseline for Broilers, do USDA-FSIS relatou que a incidência de *Salmonella* spp. e de *Campylobacter* foi de 20% e 88,2%, respectivamente (USDA, 1995). Quando os níveis de patógenos, como *Campylobacter* spp., são altos, o procedimento físico de lavar as carcaças no *chiller* de imersão pode, de fato, reduzir as contagens em aves individuais, sem mudar a prevalência geral do microrganismo. Contudo, em situações de menor prevalência, como com *Salmonella* spp., a probabilidade de disseminação para carcaças sem *Salmonella* spp. pode aumentar com o processo de resfriamento por imersão.

2.1.9 Classificação e maturação

A classificação das carcaças de frangos inclui todas as etapas de seleção para produzir diferentes produtos, incluindo a carcaça inteira, peças ou produtos desossados.

A maturação se realiza armazenando a carcaça em refrigeração por mais de 4 horas para permitir o desenvolvimento do “*rigor mortis*”, de forma a obter uma carne mais tenra, o que é essencial para a elaboração de produtos avícolas. O

processo de maturação consiste na degradação das fibras musculares pela ação enzimática, que continua depois do sacrifício. Quando as conexões musculares se degradam, a carne se torna mais tenra no momento do consumo. Destaca-se que é importante manter temperaturas baixas durante a maturação para evitar o crescimento microbiano. Há poucos estudos que relatem a contaminação bacteriana e as cargas de patógenos nessas etapas do processamento.



Figura 10 -Embalagem e classificação por partes, cortes e acondicionamento.

2.1.10 Produtos

São produzidos diferentes tipos de produto final em plantas de processamento de frangos de corte. Podem ser carcaças inteiras, peças, ou pode-se separar a carne para uso em produtos elaborados (Figura 11). Depois do processo de resfriamento, mantém-se a carcaça inteira até a embalagem. Os produtos de carcaça inteira sofrem menor manipulação e, portanto, espera-se que sua vida útil seja mais longa que a de outros produtos.

Quando se realiza cortes o processo exige a intervenção de trabalhadores experimentados, mas, quanto mais se manipula o produto, mais possibilidades há de contaminação cruzada e, portanto, a vida útil do produto será afetada. Finalmente, pode-se usar a carne separada para a preparação de produtos derivados de frangos, como salsichas, e como ingredientes de produtos elaborados. Há mais manipulação, mas geralmente os produtos elaborados são submetidos ao cozimento ou a tratamento de conservação, que reduz ou elimina a contaminação original.

Essa etapa de cozimento está ausente em carcaças inteiras e peças que são vendidas cruas em temperaturas de refrigeração.

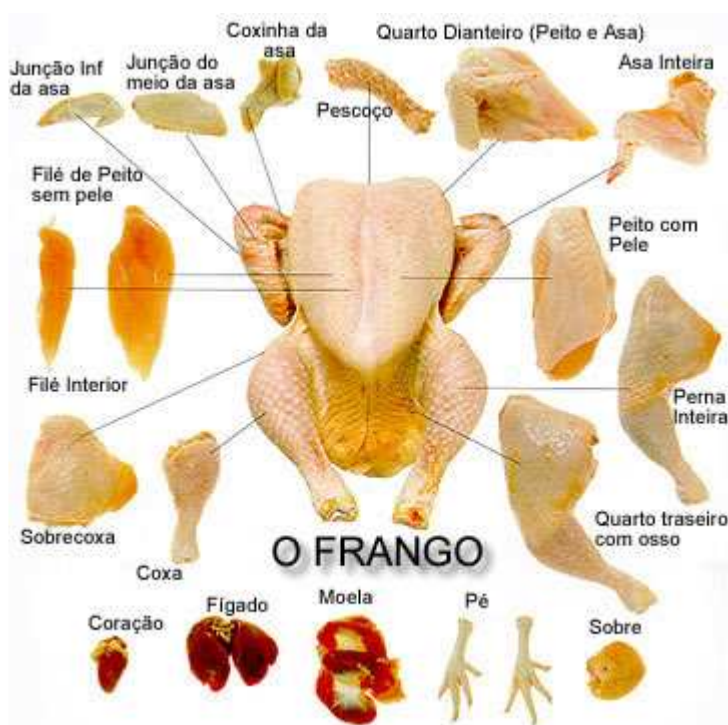


Figura 11 - Cortes de frango.

2.1.11 Embalagem

A embalagem varia com o produto, mas geralmente se embalam carcaças inteiras em bandejas de espuma com filme plástico ou sacos plásticos. Coloca-se a carcaça em cima de um material absorvente que retêm a água perdida pela carcaça. Existe uma grande diferença quando se compram produtos resfriados por imersão ou por ar, porque se supõe que os resfriados por ar perdem menos água que os resfriados por imersão, haja vista que retêm menos água.

O objetivo da embalagem é reduzir a exposição do produto a microrganismos aeróbios, mas o uso da cobertura plástica também inibe o crescimento de alguns microrganismos aeróbicos já presentes no produto, como bactérias psicotróficas responsáveis pela deterioração e degradação do produto final.



Figura 12 - Embalagem de frangos e cortes.

2.1.12 Distribuição

Depois da embalagem, os produtos são distribuídos de várias formas. Destaca-se que é importante manter a temperatura fria ao longo de todo o processo de transporte para inibir o crescimento de microrganismos e para manter a vida útil do produto. Segundo a USDA (1995), a prevalência dos principais patógenos em carcaças inteiras que saem da planta de processamento é a seguinte: *Campylobacter jejuni* (88,2%), *Staphylococcus aureus* (64%), *Clostridium perfringens* (42,9%), *Salmonella spp.* (20%) e *Listeria monocytogenes* (15%).

O controle de patógenos e de bactérias deteriorantes no processamento de aves continuará sendo um desafio para os processadores, os órgãos governamentais e para o mundo acadêmico. Os níveis de inativação obtidos com essas intervenções proporcionaram dados importantes para a incorporação em modelos de avaliação de risco microbiológico (ROSE et al., 1995; OSCAR, 1998; BROWN, 2002; OSCAR, 2004; PARSONS et al., 2004), citados por Sánchez-Plata (2007), os quais não incluem informações sobre intervenções antimicrobianas utilizadas no processamento de aves e sobre seus efeitos na redução da contaminação por *Salmonella spp.* Destaca-se que esses estudos multidisciplinares poderão desenvolver estratégias para eliminar os microrganismos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos e trazer informações científicas relevantes sobre a sobrevivência e potencial patogênico dos microrganismos, que podem resultar em aumento de sua resistência aos tratamentos e de sua capacidade de infecção.

2.2 Caracterização dos microrganismos avaliados

2.2.1 Coliformes

A presença de coliformes nos alimentos é de grande importância para a indicação de contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo pós-processamento. Segundo Franco (2005), os microorganismos indicadores são grupos ou espécies que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial de um alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

Coliformes é um grupo de microrganismos Gram-negativos, aeróbios e facultativamente anaeróbios, não formadores de esporos, com capacidade de fermentar a lactose com produção de ácido e gás a 32 – 37°C em 24 - 48 horas, em meio sólido ou líquido. São amplamente distribuídos na natureza, encontrados em grande quantidade no trato intestinal de animais e na água (SILVA; AMSTALDEN; CANTUSIO NETO, 1997). Pertencem a este grupo os gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Conforme Hajdenwurcel (1998), números elevados de coliformes totais indicam contaminação pós-processamento, limpeza e sanificação deficientes, tratamentos térmicos ineficientes ou multiplicação durante o processamento ou estocagem.

Dentro do grupo coliformes totais, o subgrupo coliformes termotolerantes é aquele composto das bactérias com forma de bastonetes, Gram-negativas, não esporuladas, anaeróbias facultativas, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido láctico e gás, em 24 horas a 44,5 – 45,5°C. A avaliação de coliformes a 45°C é essencialmente um teste para presença de *Escherichia coli*, embora algumas espécies de *Citrobacter*, *Klebsiella*. e *Enterobacter*, possam se encaixar nessa definição (SILVA et al., 2007; JAY, 2005). Dentre as bactérias de *habitat* originalmente fecal, *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos gêneros não entéricos. Embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o

momento, principalmente, pela sua relação com a presença de outros enteropatógenos, como a *Salmonella* spp. (JAY, 2005).

A presença desses microrganismos indica processamento inadequado da matéria-prima e/ou recontaminação por material fecal (BOARD, 1988).

Charlebois et al. (1991) ressaltam que o simples contato do tecido muscular subcutâneo com o material fecal pode causar uma contaminação por coliformes fecais da ordem de 10^6 bactérias/cm², sendo o suficiente para provocar uma contaminação cruzada em 10 carcaças sucessivas.

Lopes et al. (2007) encontraram médias logarítmicas de coliformes totais em 60 carcaças de frango que saíram do *chiller* entre 1,85 NMP.g⁻¹ a 3,69 NMP.g⁻¹ e para coliformes termotolerantes as médias logarítmicas variaram de 1,73 a 3,69 NMP.g⁻¹

2.2.2 *Listeria monocytogenes*

Atualmente, o gênero *Listeria* spp. é formado por oito espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *Listeria rocourtiae* e *Listeria marthii* (LECLERCQ et al., 2009; GRAVES et al., 2009). Dentre essas espécies, somente *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são patogênicas, sendo a primeira patogênica para humanos e, a segunda, para animais (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Listeria spp. apresenta flagelos peritríquios, com motilidade característica em temperatura ambiente, mas são imóveis a 37°C. Quando *Listeria* spp. é inoculada por picada em ágar semi-sólido e incubada à temperatura de 20-25°C, desenvolve uma migração típica, espalhando-se na parte superior do meio, 3 a 5mm abaixo da superfície, e mantendo-se restrita à picada no fundo do tubo. Este tipo de migração produz um crescimento, lembrando um guarda-chuva, o qual é característico deste gênero (SILVA et al., 2007).

As bactérias pertencentes ao gênero *Listeria* possuem a característica de serem muito difundidas na natureza, uma vez que estão presentes no solo, água, alimentos e na microbiota intestinal do homem e dos animais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Não obstante, o habitat primário de *L. monocytogenes* é o solo e a água, podendo contaminar, desta forma, os vegetais. Já os animais podem

carrear a bactéria assintomaticamente e, assim, disseminá-la para os alimentos de origem animal, tais como carne e leite (ROCOURT; COSSART, 1997; CDC, 2005).

Seu pH de crescimento está na faixa de 4,5 a 7,0 e pouco ou nenhum crescimento ocorre em pH 4,0 ou menor. As melhores faixas de inibição do crescimento por redução de pH estão entre 5,0 e 5,7 a 4°C, e de 4,3 a 5,2 a 30°C (PARISH; HIGGINS, 1989 apud FARBER; PETERKIN, 1991).

A listeriose está associada primariamente com alimentos prontos para consumo, despertando grande preocupação dos órgãos de saúde pública em países desenvolvidos. Tanto os alimentos frescos quanto os processados prontos para consumo normalmente são mantidos à temperatura de refrigeração, o que não impede, podendo, ainda favorecer a multiplicação de *L. monocytogenes* (Almeida et al., 1999). Schofield (1999) apud D'Angelis et al. (2004), sugerem que a mudança nos hábitos alimentares da população, como o consumo de alimentos importados, novos alimentos como os pré-prontos e ingestão de alimentos pouco cozidos, assim como o surgimento de novas tecnologias de processamento de alimentos (embalagens, refrigeração), seriam as principais causas do aparecimento de novos patógenos alimentares de características psicrotróficas, como *L. monocytogenes*.

No Brasil é possível encontrar diversas publicações sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* no ambiente e em alimentos, tais como: vegetais, esgoto, solo, carne, leite e derivados, incluindo leite cru e pasteurizado, queijos e camarão (DESTRO, 1995; ALMEIDA et al., 1999; ARAÚJO; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2002; ANTONIOLO et al., 2003; BARABALHO et al., 2005; LAER et al., 2005; SILVA et al., 2006, NALERIO et al., 2009).

Blackman e Frank (1996) verificaram que *L. monocytogenes* tem capacidade para se estabelecer e formar biofilmes nos diferentes tipos de superfícies presentes em plantas de processamento, como aço inoxidável, vidro, polipropileno e borracha. Unnerstad et al. (1996) apud Branco et al. (2003) relatam que *L. monocytogenes* pode sobreviver em indústrias de alimentos por cerca de sete anos e que os biofilmes formados por esse microrganismo funcionam como reservas de nutrientes e ainda agem como protetores do microrganismo contra os agentes sanitizantes. A alta capacidade de colonização de superfícies e formação de biofilmes por esse patógeno aumenta a possibilidade de contaminações cruzadas e ambientais nas plantas de processamento (SILVA et al., 2004).

É interessante ressaltar que o isolamento de outras espécies de *Listeria* diferentes de *L. monocytogenes* (única patogênica para humanos), demonstra que o ambiente está propício para o desenvolvimento deste microrganismo, já que todas as espécies de *Listeria* apresentam padrão de crescimento e comportamento similar em relação ao seu cultivo. Assim, a presença de *Listeria* spp. pode indicar uma maior probabilidade de ocorrência de *L. monocytogenes* no local, havendo grande risco para a segurança alimentar (SILVA et al., 2004).

De acordo com Norrung e Buncic (2007) dados relatando a ocorrência de *L. monocytogenes* são escassos porque o monitoramento deste patógeno é focado primeiramente em alimentos prontos para consumo. Os autores destacam que o ambiente de processamento é a fonte de contaminação destes produtos e podem conter um alto número de *L. monocytogenes*.

A ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos avícolas relatada na literatura é bastante variável. Na Bélgica, foram avaliadas 772 amostras de carcaças de frango e produtos de aves à venda no mercado varejista local, encontrando-se 38,2% de ocorrência de *L. monocytogenes* (UYTTENDAELE et al., 1999). Soultos et al. (2003), na Irlanda, avaliaram *Listeria* spp. em retalhos de frango em supermercados, encontrando *Listeria* spp. em 38 de 80 amostras (48%), sendo 14 (18%) identificadas como *L. monocytogenes*. Em trabalho realizado na mesma região onde esse estudo foi desenvolvido, (Sul do Rio Grande do Sul, Brasil), Nalério et al. (2009), avaliaram 45 amostras de frangos resfriados procedentes do comércio, encontrando *L. monocytogenes* em 33,3% das amostras.

O patógeno causa doença em pessoas com a imunidade diminuída, como pacientes com AIDS, leucemia ou outras doenças neoplásicas, transplantados, portadores de insuficiência cardíaca, diabetes, mulheres grávidas, neonatos, bebês e idosos, entre outros (ALMEIDA et al., 1999; TORTORA et al., 2005). Indivíduos adultos saudáveis não desenvolvem a doença, mas existem relatos de que possam apresentar sintomas gastrintestinais, ao contrário dos quadros encontrados nas pessoas suscetíveis, que incluem sintomas similares aos da gripe, como febre e mal-estar geral, podendo evoluir para meningoencefalite, septicemia, aborto e meningite (SILVA et al., 1997; BRANCO et al., 2003). A listeriose em seres humanos pode ser diagnosticada através do isolamento do agente a partir do sangue, do fluido cefalorraquidiano, placenta e feto. A dose infectiva ainda é desconhecida,

podendo variar de acordo com a cepa bacteriana e com a suscetibilidade da vítima (FORSYTHE, 2002).

2.3 Sistema APPCC

Desde a década de 80, as empresas processadoras de alimentos têm redirecionado seus modelos de gestão da qualidade de modo a torná-los mais preventivos e menos corretivos. A constatação da incapacidade de garantir a inocuidade dos alimentos pelos métodos tradicionais de Inspeção e Controle de Qualidade bem como a necessidade cada vez maior de se racionalizar os recursos através da otimização dos processos, reduzindo-se as perdas e re-trabalhos, tem demonstrado a necessidade de se alterar o modelo de trabalho das empresas. A crescente globalização dos mercados está exigindo das companhias a adoção de sistemas de controle reconhecidos internacionalmente (ALFREDO, 2006).

Juran (1997) afirma que a qualidade, no início do século XX, já era uma preocupação das pequenas fábricas. Segundo o autor, o proprietário da época, além de ser o artesão mestre, determinava como o trabalho deveria ser feito, fazia o planejamento da qualidade, treinava os operários e verificava os resultados. Esta concepção aplica-se a todos os setores industriais, evidenciando-se ainda mais na área de alimentação, onde pela própria natureza dos objetivos propostos, preocupa-se com a qualidade de vida do indivíduo. A não qualidade tem efeitos irreparáveis, onde o erro pode gerar danos à saúde e sofrimento para as pessoas (COLOMBO, 1999).

A maioria dos programas de controle de qualidade usados na produção de alimentos até os anos 80 empregava uma combinação de métodos tradicionais de inspeção por amostragem, investigação e testes do produto final. Por caracterizarem um controle passivo, não permitiam a adoção imediata de medidas corretivas durante o processo (ABDALLAH, 1997; ALMEIDA, 2001).

Atualmente, esta abordagem tradicional de controle de qualidade tem sido substituída pela garantia de qualidade. Dentro deste novo enfoque há um controle dinâmico em pontos considerados críticos, identificando perigos (biológicos, físicos ou químicos), podendo-se intervir no resultado final a ser obtido numa linha de

produção, bem como atuar preventivamente, buscando-se assegurar a inocuidade e qualidade dos alimentos (MENDES, 1998; ALMEIDA, 2001).

A Organização Mundial de Saúde estima que as enfermidades causadas por alimentos contaminados constituam um dos problemas sanitários mais difundidos no mundo de hoje. Portanto, oferecer um alimento seguro, do ponto de vista de saúde pública, no qual constituintes ou contaminantes que causem perigo à saúde estão ausentes ou abaixo do limite de risco, passa a ser a meta da maioria das empresas da área de alimentos (DESTRO, 1996 apud FRANCO; LANDGRAF, 2002).

O sistema Análise de Perigos e Pontes Críticas de Controle (APPCC) relaciona-se completamente à produção de alimentos seguros e é uma abordagem preventiva e sistemática direcionada a perigos biológicos, químicos e físicos, através de antecipação e prevenção, em vez de inspeção e testes em produtos finais (FAO, 1998).

O termo “alimento seguro” é um conceito que está crescendo na conjuntura global, não somente pela sua importância para a saúde pública, mas também pelo seu importante papel no comércio internacional (BARENDZ, 1998).

Este sistema foi utilizado pela primeira vez, nos anos 60, pela Pillsburg Company, junto com a *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) e o U.S. Army Laboratories, com o objetivo de criar um programa de qualidade que, utilizando algumas técnicas, garantisse o fornecimento de alimentos seguros para os astronautas da NASA (BENNET; STEED, 1999). A legislação em segurança do alimento é geralmente entendida como um conjunto de procedimentos, diretrizes e regulamentos elaborados pelas autoridades, direcionados para a proteção da saúde pública.

A ‘não qualidade’ tem efeitos irreparáveis, onde o erro pode gerar danos à saúde e sofrimento para as pessoas (COLOMBO, 1999). Portanto, a implementação do sistema APPCC reduz a necessidade de inspeção e teste de produto final, aumenta a confiança do consumidor e resulta num produto comercialmente mais viável. Facilita o cumprimento de exigências legais e permite o uso mais eficiente de recursos, acarretando redução nos custos da indústria de alimentos e uma resposta mais imediata para as questões de segurança de alimentos. Ocorre o aumento da responsabilidade e o grau de controle da indústria de alimentos e um sistema APPCC implementado de modo adequado, estimula maior envolvimento dos

manipuladores de alimentos e garante a segurança do alimento, além de motivar os funcionários (FAO, 1998).

O sistema APPCC pode ser aplicado em todas as etapas de processamento e desenvolvimento de alimentos, desde os primeiros estágios da produção até o consumo. Os princípios APPCC são aplicáveis a toda e qualquer atividade relacionada a alimentos. Um plano APPCC, entretanto, é específico para o produto e o processo, o que explica sua restrição a algumas etapas, como transformação e/ou processos industriais. Todas as pessoas que participam do setor produtivo de alimentos devem estar envolvidas na implementação do sistema e dos princípios APPCC e, se necessária, na elaboração do plano APPCC (GUIA, 2000).

O comércio internacional de alimentos é regulamentado pela Organização Mundial do Comércio (OMC), que garante que todas as relações econômicas envolvendo alimentos sejam controladas por normas, diretrizes e recomendações da Comissão do *Codex Alimentarius*, da Organização Internacional de Epizootias (OIE) e da Convenção Internacional de Proteção Fitossanitária (SANTIAGO, 1998).

Os padrões, diretrizes e outras recomendações do *Codex* tornaram-se a base identificada para a produção de alimentos seguros e proteção do consumidor no comércio internacional de alimentos. Assim, as Diretrizes para a Aplicação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) do *Codex Alimentarius* tornou-se o ponto de referência para as exigências internacionais de segurança de alimentos (FAO, 1998).

No Sistema APPCC, perigo significa condições ou contaminações que podem causar doença ou danos à saúde do consumidor. Esta definição não se aplica a outras condições indesejáveis ou a presença de outros tipos de contaminantes como insetos, cabelo, decomposição, fraude econômica, violação das exigências de qualidade.

2.4 Caracterização do produto TIMSEN[®] - N – Alquil dimetil benzil amônia clorado (40%)

É um composto formulado, na forma de cristais granulados solúveis, com 40% de radicais alquílicos benzílicos encapsulados, em 60% de uréia estabilizada tipo G.R.A.S. (Generally Recognized As Safe).

2.4.1 Estrutura da molécula

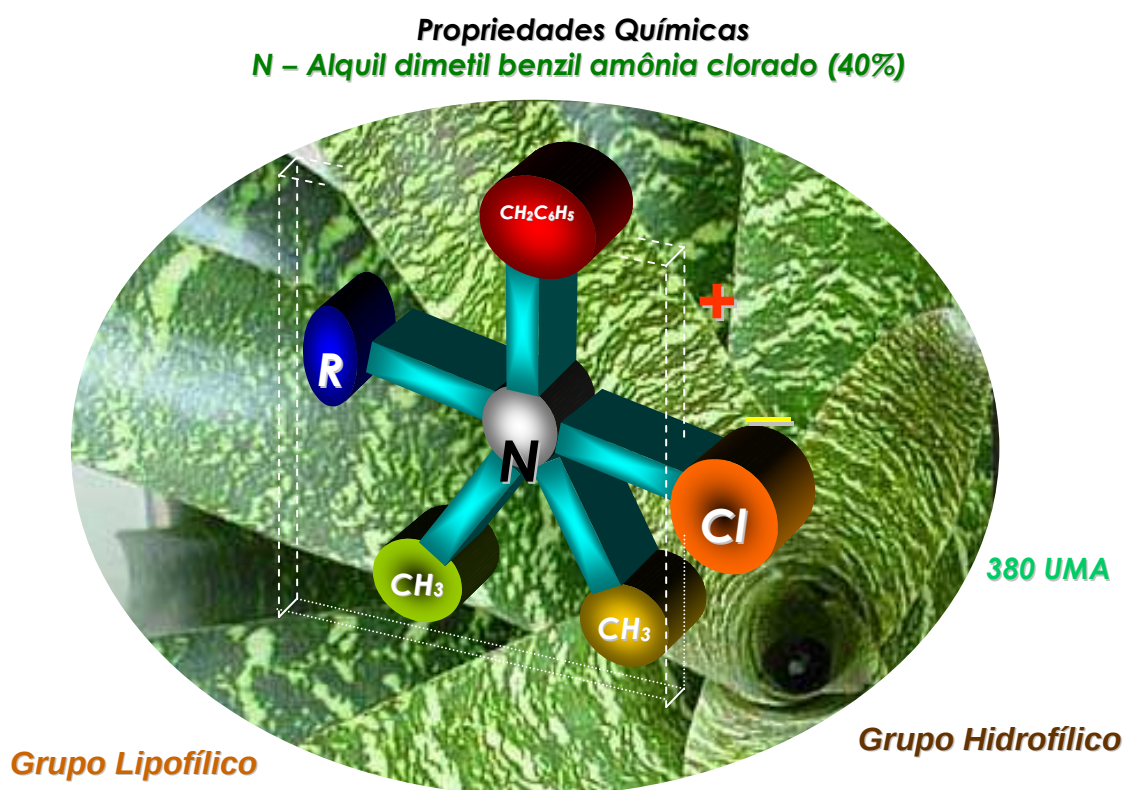


Figura 13 - Configuração estrutural do TIMSEN[®].

2.4.2 Mecanismo de ação

De acordo com o fabricante, o grupo lipofílico da molécula possui a função de aderir-se a capa lipídica da parede celular bacteriana ocasionando mudanças físicas que levam a posterior mudança química mediante a desnaturação de

proteínas, e com a consequente destruição dos microrganismos. Devido a seu mecanismo multifocal de ação e as drásticas e irreversíveis mudanças que gera, TIMSEN® assegura uma destruição muito satisfatória dos microrganismos e dificulta a aquisição de resistência ao produto.

2.4.2 Ação tenso ativa do produto

Quando adicionado a água, o produto elimina o efeito de eletronegatividade (quebra as pontes de hidrogênio), permitindo que a água penetre em reentrâncias microscópicas levando consigo o princípio ativo para atuar sobre os microrganismos. Além disso, TIMSEN® reduz a tensão superficial da água através da quebra das pontes de hidrogênio dentro das moléculas.

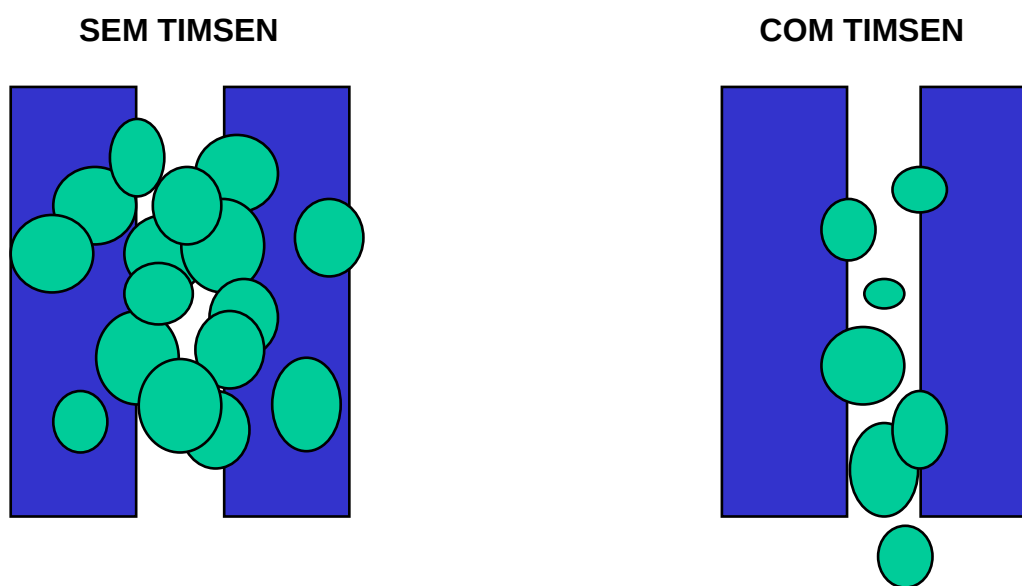


Figura 14 - Representação da diminuição da tensão superficial da água.

TIMSEN® tem sido muito estudado em várias partes do mundo (Brasil, Colômbia, México Estados Unidos, etc.), no controle de patógenos em todos os pontos críticos de controle (PCC), nas indústrias e em vários outros pontos da cadeia de produção, bem como em hospitais, floriculturas e indústrias de outra natureza. O produto tem sido testado em esquentadores, *pré-chiller* e *chiller*, com

matéria orgânica, bem como em equipamentos, para o controle de vários organismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários.

Os testes de eficácia do TIMSEN® vêm sendo realizados utilizando-o na linha de produção, principalmente na água de escaldagem e na água do *pré-chiller* e do *chiller*. Apesar de serem em nível de pesquisa, esses testes vem demonstrando que o produto é bastante eficiente, tanto no controle de patógenos quanto no controle de microrganismos deteriorantes de alimentos. Em anexo apresentamos uma série de testes e ensaios laboratoriais realizados por solicitação do fabricante, demonstrando sua eficácia frente a diversos microrganismos de importância em alimentos.

2.4.3 Indicações de uso do produto

Segundo fabricante e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento através da Utilização de Uso do Produto (AUP), N.º 3760/2005 de 28 de dezembro de 2005, com validade até 28 de dezembro de 2015 (Anexo A), este produto está indicado como sanitizante com ação bactericida e fungicida em instalações, equipamentos e utensílios de indústrias que processam alimentos de origem animal.

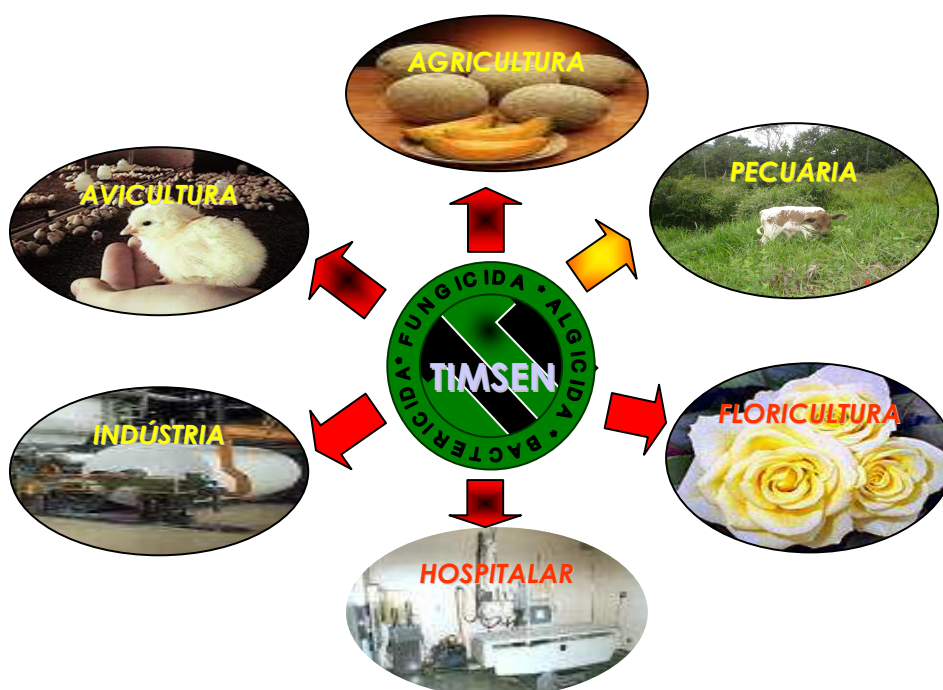


Figura 15 - Setores onde o produto TIMSEN® tem sua utilização.

2.4.4 Ação do TIMSEN® :

TIMSEN® possui um amplo espectro de ação é fungicida, viricida, bactericida e algicida, é ativo na presença de matéria orgânica, e na presença de “água dura” até 550ppm, atua numa ampla faixa de pH (ativo em pH 3 a 11), possui seu pH neutro, possui ação em biofilmes pelo seu poder de penetração, é altamente estável, apresenta-se sob a forma de cristais solúveis em água (alta e baixa temperatura), possui efeito tensoativo: reduz a tensão superficial da água, possui efeito residual prolongado (10 a 14 dias), não é corrosivo e não é irritante, é biodegradável e não polui o meio ambiente. Poucos produtos possuem todas estas características, portando trata-se de um produto diferenciado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estabelecimentos estudados

As amostras foram coletadas entre novembro de 2008 e julho de 2009, em três plantas de abate de aves (Plantas A, B e C), localizadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil, totalizando quatro coletas. Os estabelecimentos possuem inspeção sanitária oficial, sendo todas de pequeno porte. A Planta A abate cerca de 22.000 aves por dia, a Planta B abate 400 aves/dia, e a Planta C, realiza um abate de 500 aves por semana. A Planta A possui sua linha de abate mecanizada e as outras duas não, possuindo deficiências estruturais, de equipamentos e de condições higiênico-sanitárias.

Para melhor compreensão das plantas estudadas, segue uma breve descrição da linha de processamento das mesmas, onde mostrado um fluxograma simplificado das etapas do abate e conseqüentemente as fases mais críticas do abate onde este estudo procurou demonstrar a eficácia do produto TIMSEN® (Fig. 16).

Com relação a água de pré-resfriamento, as amostras foram coletadas antes e após a adição do produto TIMSEN® no tanque de pré-resfriamento (*chiller*), contendo água com temperatura entre 0 e 4°C. A concentração do produto também foi a mesma utilizada para água de escaldagem, ou seja, 200ppm (partes por milhão), sempre obedecendo as recomendações do fabricante.

A adição do produto a água de pré-resfriamento foi realizada em todos os frigoríficos avaliados, sempre a partir de 2 horas de fluxo contínuo de passagem de frangos pelo tanque de pré-resfriamento, de acordo com a velocidade de abate de cada estabelecimento, a fim de que se pudesse ter matéria orgânica com contagens microbianas similares, e termos maior confiabilidade nos resultados.

A temperatura da água de pré-resfriamento em todas as coletas estava em 4°C no momento da adição do produto TIMSEN® a água e, a coleta só foi realizada após 20 minutos, para ter o tempo necessário para ação do produto.

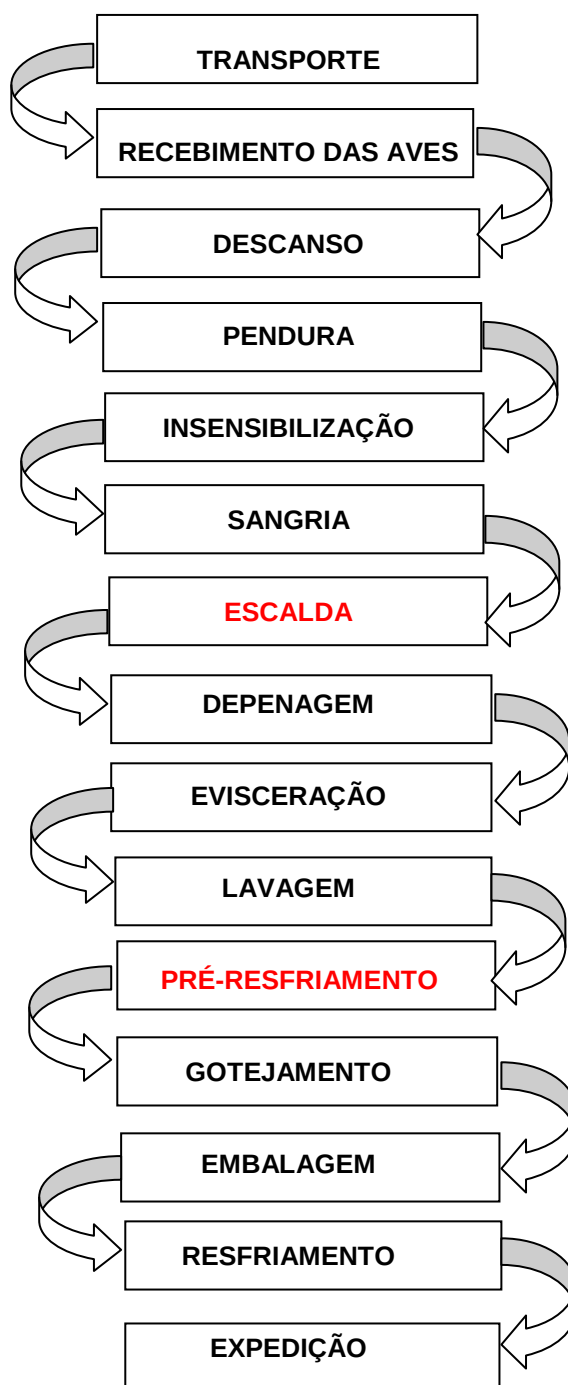


Figura 16 - Representação esquemática das linhas de abate de aves de três abatedouros localizados no sul do Rio Grande do Sul.

Todas as plantas estudadas apresentam as etapas descritas acima de forma a proporcionar um abate de forma satisfatória, no que se referem ao atendimento as Normas Técnicas de abate de aves de cada Serviço de Inspeção (SIF, CISPOA e

SIM), se diferenciando apenas no que tange a tamanho e automação das plantas de abate.

As aves chegam à indústria através de caminhões, acomodadas em caixas plásticas de transporte, agrupadas em lotes de 8 a 10 por caixa. Na plataforma de desembarque, são penduradas na nórea, onde recebem atordoamento através de eletronarcose, com baixa voltagem e alta amperagem. As aves são conduzidas pela nórea até chegarem à sala de sangria, onde sofrem secção manual dos grandes vasos cervicais veias jugulares e artérias carótidas, esse procedimento de sangria se estende por até 4 minutos. Decorrido este período as aves são encaminhadas para a escaldagem com água a 58°C, onde permanecem por 2 a 3 minutos e, em seguida, são direcionadas à depenadeira. Após, são submetidas a lavagens com água clorada a temperatura ambiente e, são dirigidas à sala de evisceração, para a retirada das vísceras. As vísceras comestíveis (coração, moela e fígado) são conduzidas até um resfriador (*chiller*) de vísceras e as demais são direcionadas para a graxaria. Após esse procedimento, as carcaças são encaminhadas, através da nórea, para a sala de resfriamento, onde permanecem no pré-resfriador (pré-*chiller*) em torno de 12 minutos, até alcançarem temperatura de, no máximo, 14 a 16°C. Quando essa temperatura é atingida, são retiradas desse equipamento, com auxílio de uma rosca sem fim, e direcionadas para o resfriador (*chiller*), onde permanecem por 24 a 25 minutos, até alcançarem a temperatura final de, no máximo 7°C.

A planta A, possui Inspeção Federal (Registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), o abate todo automatizado, trabalha em abates diários abatendo cerca de 22.000 aves por dia. Possui sistema de autocontroles implantados como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Programas Para Higiene Operacional (PPHO) possui departamento de qualidade implantado e funcionando. Produz frangos inteiros, cortes, e miúdos de frango tanto congelados quanto resfriados.

A planta B, possui Inspeção Estadual (Registro na Secretaria da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio do Estado do RS), o abate se dá em operações de forma semi-automatizada, possui abate diário de 400 frangos, não possui programas de autocontroles (BPF e PPHO), não possui departamento de qualidade, sua infraestrutura e equipamentos são mais simples o estabelecimento é menor, considerado um estabelecimento de pequeno porte. Produz somente frangos e miúdos resfriados.

A Planta C possui Inspeção Municipal (Registro na Secretaria da Agricultura e Desenvolvimento Rural do município de Pelotas), realiza apenas um abate semanal abatendo cerca de 500 aves cada abate. A planta é considerada de pequeno porte e suas operações se dão de forma muito lenta e semi-automática, não possui programas de autocontrole implantados (BPF, PPHO), não possui departamento de qualidade, produz apenas frangos e miúdos refrigerados.

3.2 Processo de amostragem

As amostragens foram bimensais, realizadas durante o abate de aves em três plantas de abate localizadas no sul do Rio Grande do Sul, seguindo metodologia preconizada pela APHA (2001).

3.2.1 Água e matéria-prima

Foram coletadas 16 amostras de 500mL de água sendo 8 na etapa de escaldagem e 8 da água de pré-resfriamento, sendo 4 antes e 4 após a adição do produto estudado (TIMSEN®), estas amostras foram coletadas em 3 plantas processadoras sendo em 4 coletas, sendo 2 da água de escaldagem e duas da água de pré-resfriamento cada coleta.

A concentração do produto TIMSEN® utilizada foi a recomendada pelo fabricante que foi de 200ppm (partes por milhão), ou 1 grama do produto por 2L de água, tanto na água de escalda quanto na água do pré-resfriamento.

A verificação da concentração se deu através de uma fita indicadora fornecida pelo fabricante, que através de um gradiente de cores nos fornece a concentração aproximada do produto, como mostra a (Fig. 17 A e B).

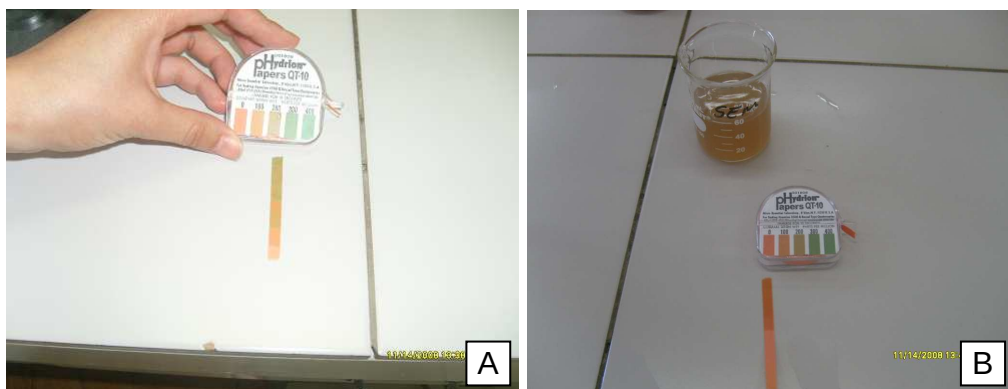


Figura 17 - A) água com 200ppm de TIMSEN®; B) ausência do produto na água.

As amostras foram coletadas em frascos esterilizados (Fig. 18), acondicionados sob refrigeração e transportados para o laboratório – DCTA- FAEM – UFPEL (Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Elizeu Maciel da Universidade Federal de Pelotas), onde foram analisadas.



Figura 18 - Processo de coleta da água de escaldagem.

Também foram coletadas 72 amostras de frangos através da técnica de lavagem superficial de carcaças, utilizando-se 225mL de água peptonada tamponada para frangos depenados, que pesavam, em média, 2,0 kg, e 450mL para frangos com penas, coletados antes da escaldagem, pesando aproximadamente 3,0kg. As amostras dos frangos foram obtidas sempre em três pontos da linha de abate: antes da escalda, após a escalda e após o pré-resfriamento, coletando-se

antes e após a colocação do produto TIMSEN® na água de escalda e de resfriamento.

Das 72 amostras coletadas de frangos 24 foram coletadas antes da escalda, 24 após a escalda e 24 coletadas após o pré-resfriamento. Em cada ponto destes citados 12 amostras coletadas antes da adição do produto TIMSEN® e 12 após a adição do produto.



Figura 19 - A) identificação dos frangos; B) identificação das carcaças

Os frangos foram inicialmente identificados com lacres numerados já na área da pendura das aves (Fig. 19 A), de forma que o mesmo frango fosse amostrado nos 3 pontos (Fig. 19 B). Utilizaram-se sacos plásticos esterilizados com capacidade de envase de 10 kg, para facilitar o processo de coleta das amostras das superfícies das carcaças, onde a água peptonada tamponada foi vertida cuidadosamente, de forma asséptica, sendo a carcaça de frango imersa nessa solução. A seguir, cada carcaça foi massageada pela superfície externa do saco plástico, por cerca de 20 segundos (Fig. 20).



Figura 20 - Processo de amostragem e acondicionamento das amostras.

Após, as amostras foram devidamente lacradas com fita adesiva acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas até o laboratório-DCTA- FAEM – UFPEL (Departamento de Ciências e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Elizeu Maciel da Universidade Federal de Pelotas onde foram imediatamente analisadas.

As coletas das carcaças foram padronizadas em todas as etapas, começando sempre às 09:00h da manhã quando já haviam sido transcorridas cerca de 2h de abate normal dentro da rotina de cada estabelecimento. A temperatura da água de escalda foi de aproximadamente 58 a 60°C, e a temperatura da água de pré-resfriamento inferior à 4°C. Essa padronização da temperatura da água visou minimizar a variação da carga microbiana por fatores que não sejam os do antimicrobiano estudado.

3.2.1.1 Análises microbiológicas da água

3.2.1.1.1 Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios

A metodologia utilizada seguiu o protocolo descrito pela APHA, 2001. Uma alíquota de 1mL da diluição inicial (10^0), tanto da água de escaldagem quanto da água de pré-resfriamento, até a diluição 10^{-5} foi semeada em placas de Petri esterilizadas, contendo ágar padrão para contagem, previamente fundido e resfriado a temperatura de $\pm 45^\circ\text{C}$.

Após homogeneização da amostra e solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas, invertidas, a 37°C por 48 horas para a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios.

As contagens das colônias foram realizadas em contador de colônias, segundo a técnica padrão, preferencialmente em placas que apresentavam entre 25 e 250 colônias. O número de colônias contadas na placa forneceu o número de microrganismos mesófilos por mL da solução inicial.

3.2.1.2 Análises microbiológicas dos frangos

3.2.1.2.1 Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios

A metodologia utilizada seguiu o protocolo descrito pela APHA, 2001. Uma alíquota de 1mL da diluição inicial (10^0) até a diluição 10^{-5} foi semeada em placas de Petri esterilizadas, contendo ágar Padrão para Contagem, previamente fundido e resfriado a temperatura em torno de $\pm 45^\circ\text{C}$. Após homogeneização e solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas, invertidas, a 37°C por 48 horas para a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios.

As contagens das colônias foram realizadas em contador de colônias, segundo a técnica padrão, preferencialmente em placas que apresentavam entre 25 e 250 colônias. O número de colônias contadas na placa, correspondente forneceu o número de microrganismos mesófilos por mL da solução inicial. No caso de alimentos o resultado deve ser expresso em UFC.g^{-1} da amostra, portanto através da fórmula abaixo se converteu o resultado de UFC.mL^{-1} para UFC.g^{-1} .

$$\text{UFC.g}^{-1} = \text{UFC.mL}^{-1} \times \frac{\text{Volume de diluente usado na lavagem}}{\text{Peso da amostra lavada}}$$

3.2.1.2.2 Contagem de coliformes termotolerantes

Para a confirmação de coliformes termotolerantes e totais utilizaram-se testes adicionais de identificação. Segundo Forsythe (2002), coliformes termotolerantes são definidos como coliformes capazes de fermentar a lactose em meio EC, com produção de gás, no período de 48 horas, a $45,5^\circ\text{C}$. O teste foi realizado a partir das colônias suspeitas no isoladas em ágar VRBA (Figura 21 A). A metodologia utilizada seguiu o protocolo estabelecido pelo Ministério da Agricultura para análise de alimentos de origem animal, segundo Instrução Normativa número 62, de 26 de agosto de 2003, para análise de coliformes em VRBA. Foram inoculados, com uma alçada, tubos correspondentes contendo caldo *Escherichia coli* (EC) e tubo de Durham invertido. A incubação foi realizada em banho-maria a $45 \pm$

0,2°C por 24 a 48 horas e considerados positivos os tubos com crescimento bacteriano e produção de gás.

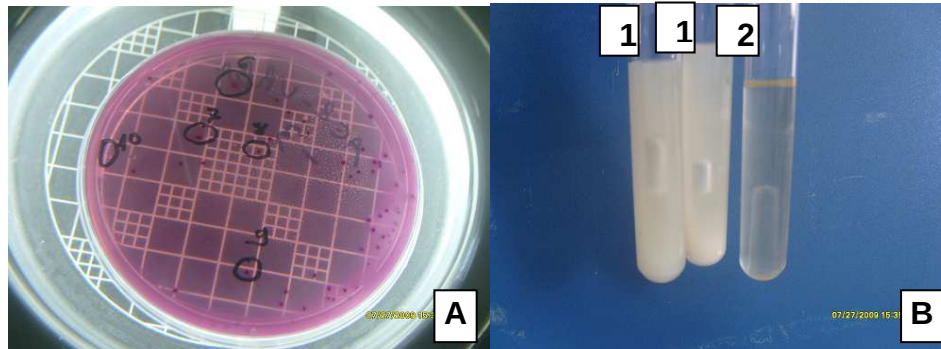


Figura 21 - A) Placa de Petri com crescimento de colônias típicas de coliformes; B) Tubos com produção de gás (1), positivos para coliformes, e sem produção (2), negativo para coliformes

3.2.1.2.3 Isolamento e identificação de espécies de *Listeria*

3.2.1.2.3.1 Isolamento de colônias presuntivas de *Listeria* spp.

O isolamento e a identificação de espécies de *Listeria* foram realizados conforme descrito por Farber et al. (1994) e contempla as seguintes etapas.

a) Enriquecimento seletivo primário

Das amostras provenientes das carcaças, inoculou-se 1mL em tubos contendo 10mL de caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB - Oxoid®), os quais foram incubados por 24h à 30°C.

Listeria monocytogenes

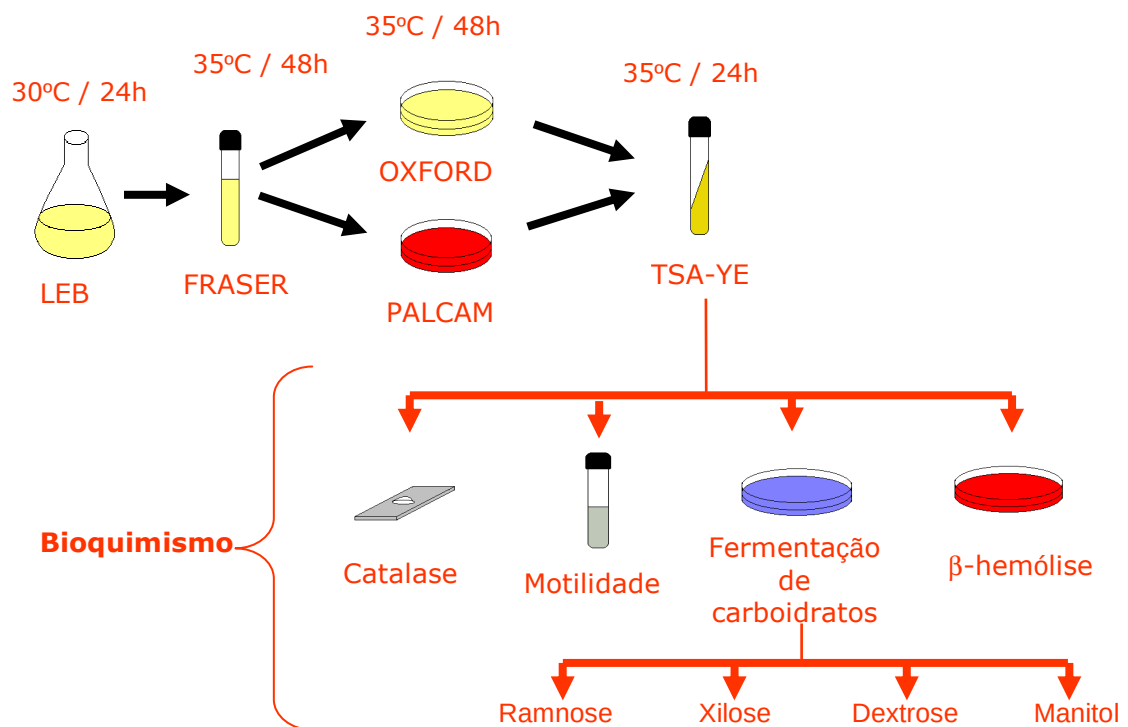


Figura 22 - Esquema demonstrando as etapas de isolamento de *Listeria* spp.

b) Enriquecimento seletivo diferencial

Após o enriquecimento primário, dos tubos de LEB que enegreceram (pela hidrólise da esculina presente no meio), foi realizado um segundo enriquecimento, em caldo Fraser (Oxoid®) adicionado do suplemento SR156 (Oxoid®), onde se inoculou 0,1mL de cada cultura em tubos contendo 10mL de caldo Fraser, incubando-se por 48 horas a 35°C.

c) Isolamento de colônias características

As culturas que produziram escurecimento do caldo Fraser (devido a hidrólise da esculina, componente diferencial do meio), foram estriadas em placas de petri contendo os ágaros Oxford (Oxoid®) adicionado do suplemento SR140 (Oxoid®), e Palcam (Oxoid®) adicionado do suplemento SR150E (Oxoid®), com o

auxílio de alça de níquel-cromo, a fim de obter o isolamento de colônias típicas. As placas foram incubadas durante 48 horas a 35°.

d) Sub cultivo das colônias características

Foram selecionadas de 3 a 5 colônias características de *Listeria* spp. em cada Placa de Petri (colônias com coloração cinza esverdeada, centro côncavo e halo negro no ágar Palcam e coloração negra com centro côncavo e halo negro no ágar Oxford), as quais foram repicadas com o auxílio de uma agulha de inoculação para tubos de ensaio contendo ágar Triptona de Soja (Oxoid®) com 0,6% de Extrato de Levedura (Oxoid®) (TSA-YE) e incubadas a 35°C por 24 horas. Após, todos os isolados foram submetidos aos testes fenotípicos necessários à confirmação e identificação em nível de espécie.

e) Confirmação e identificação de *Listeria* spp. em nível de espécie

Para a confirmação do gênero e identificação em nível de espécie, foram utilizados os seguintes testes: produção de catalase, motilidade a 25°C, produção de β -hemólise em ágar Sangue de Cavalo (ágar Triptona de Soja com 7% de sangue desfibrinado de cavalo) e fermentação de carboidratos (dextrose, ramnose, xilose e manitol). A interpretação foi realizada conforme descrito na tab. 1.

Tabela 1 – Características empregadas para a confirmação e identificação das espécies de *Listeria* spp isoladas neste trabalho (adaptado de Holt et al., 1994).

	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>L.</i> <i>seeligeri</i>	<i>L.</i> <i>ivanovii</i>	<i>L.</i> <i>innocua</i>	<i>L.</i> <i>welshimeri</i>	<i>L.</i> <i>grayi</i> [MICROB1]
Catalase	+	+	+	+	+	+
Motilidade tipo guarda-chuva	+	+	+	+	+	+
β-hemólise	+	+	+	-	-	-
Fermentação de:						
Dextrose	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-
Xilose	-	+	+	-	+	-
Ramnose	+	-	-	V	V	-

V = Variável

+ = Positivo

- = Negativo

Os isolados a serem testados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 4mL de *Motility Test Medium* (Difco®), com o auxílio de uma agulha de inoculação, picando-se o ágar até o terço inferior à sua profundidade. Foi feita a incubação a 25°C, temperatura onde a motilidade característica de *Listeria* spp. é manifestada, por um período de até 7 dias. Foram efetuadas observações diárias, a fim de se constatar a presença da motilidade característica do gênero, ou seja, motilidade com aspecto de guarda-chuva no terço superior do ágar, indicando, também, a característica de microaerofilia apresentada por esses microrganismos.

Para o teste de produção de catalase, foi preparada uma suspensão bacteriana, a partir de cultivo recente em TSA-YE a ser testado, e de uma alçada de solução salina a 0,85% esterilizada, na superfície de uma lâmina de microscopia, previamente desengordurada com álcool etílico 96°GL. A essa suspensão, adicionou-se uma gota de água oxigenada a 3%, verificando-se o surgimento ou não de bolhas de oxigênio, por até 2 minutos, como consequência da presença ou não da enzima.

O teste de produção de β -hemólise foi executado em ágar Sangue de Cavalo (TSA-Sangue), sendo cada Placa de Petri demarcada em sua porção inferior de modo a identificar 20 espaços, onde cada espaço recebeu uma picada do respectivo isolado a ser testado. Após a inoculação, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 horas. Decorrido esse intervalo, foram examinadas sob luz clara, de forma a identificar possíveis zonas de clareamento ao redor do crescimento (hemólise), provocadas pela produção de β -hemolisina. O resultado para cada isolado foi registrado como não hemolítico (sem alteração no meio ao redor do crescimento bacteriano) ou β -hemolítico (com uma zona de clareamento total ao redor do inóculo).

No teste de fermentação de carboidratos, cada placa de ágar Púrpura de Bromocresol, acrescida do respectivo açúcar (dextrose, ramnose, xilose ou manitol) a ser testado, foi demarcada, em sua porção inferior, identificando-se 12 espaços. Em cada espaço foi inoculada, por picada, uma das culturas. Após a inoculação, as placas foram incubadas, invertidas, por 24 horas a 35°C. O resultado positivo era indicado pelo surgimento de um halo amarelo ao redor da picada, devido à produção de ácido pelo microrganismo. Os resultados foram registrados como positivos ou negativos para cada carboidrato.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito do TIMSEN® na água da escaldagem e do pré-resfriamento

A tab. 2 a seguir demonstra os resultados da contagem de mesófilos aeróbios na água de escaldagem de frangos antes e após a adição do produto TIMSEN®, em quatro coletas realizadas em três plantas de abate de aves localizadas no sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

Tabela 2 - Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios em água de escaldagem de frangos.

Abatedouros	Diluição				UFC.mL ⁻¹
	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
Coleta n.º 1 – S/T A	+250	+250	28	0	2,8x10 ²
Coleta n.º 1 – CT A	0	0	0	0	0
Coleta n.º 2 – S/T B	+250	35	0	0	3,5x10 ¹
Coleta n.º 2 – CT B	0	0	0	0	0
Coleta n.º 3 – S/T B	+250	+250	+250	40	4,0x10 ³
Coleta n.º 3 – CT B	60	30	7	0	4,2x10 ¹
Coleta n.º 4 – S/T C	+250	136	33	3	3,3x10 ²
Coleta n.º 4 – CT C	0	0	0	0	0

S/T = Amostra de água de escalda sem adição de TIMSEN®

C/T = Amostra de água de escalda com adição de TIMSEN®

A – Planta A – primeira coleta

B – Planta B – segunda e terceiras coletas

C – Planta C – quarta coleta

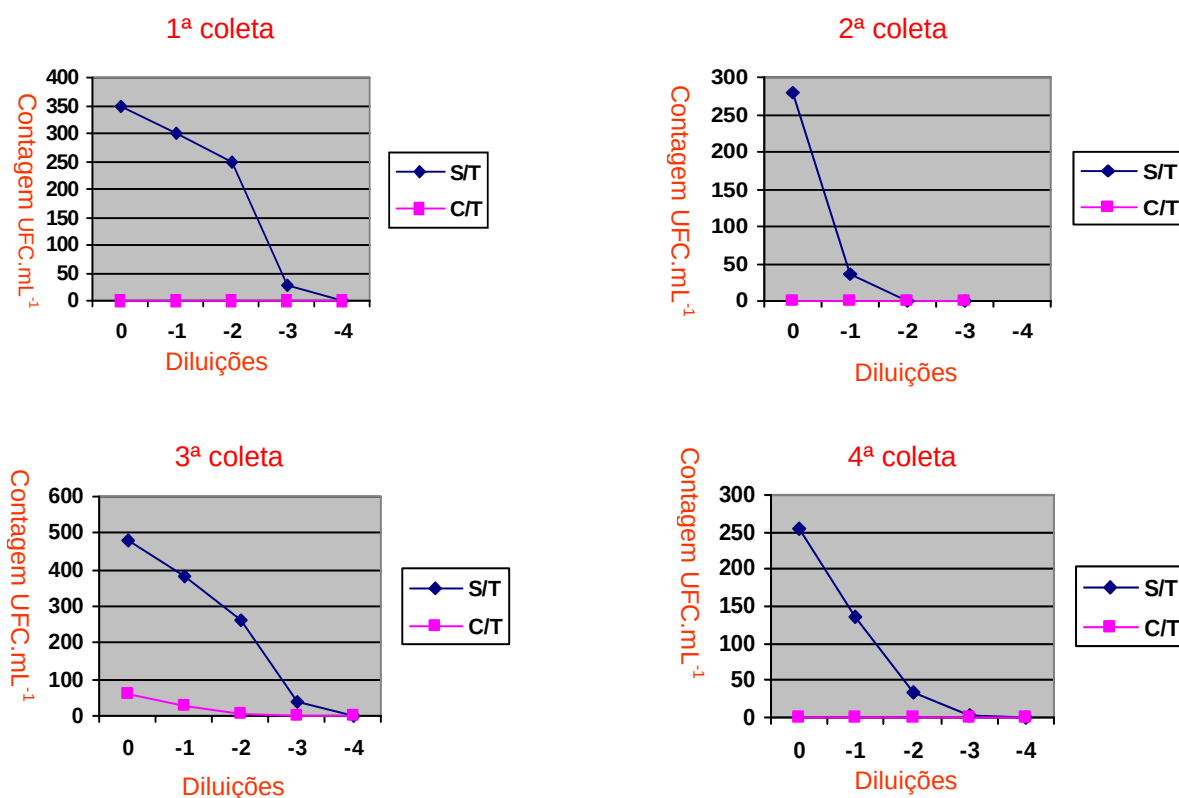
Observou-se que houve redução da carga microbiana da água de escaldagem quando comparada com os resultados das coletas realizadas antes da adição do produto TIMSEN®.

A contagem de microrganismos mesófilos aeróbios foi reduzida em dois ciclos logarítmicos em média, nas amostras controle (sem TIMSEN®). Nestas

amostras, verificou-se crescimento até a diluição de 10^{-3} e, acima disso, não houve crescimento de mesófilos aeróbios. Nas amostras com a adição de TIMSEN®, com exceção da terceira coleta realizada na Planta 2, não se verificou crescimento microbiano, demonstrando a ação efetiva do produto (Figura 23).

Houve diferença entre os resultados de duas coletas no mesmo estabelecimento (Planta B) onde houve reduções entre 1 e 2 ciclos log, da primeira para segunda coleta, diferença esta atribuída ao tempo necessário em que o produto permaneceu em contato com a água antes de se realizar a coleta, devido principalmente a operacionalização do estabelecimento onde não foi permitido que se pudesse deixar cerca de 20 minutos de tempo considerado ideal para ação do produto sobre a carga microbiana. Quando se trabalha em abate de aves o tempo, às vezes, não permite que se espere determinado período, pois compromete todo andamento das etapas seguintes, podendo comprometer a qualidade dos produtos.

Geralmente, nas primeiras duas horas de abate, a contagem microbiana da água de escaldagem tende a aumentar, devido ao incremento de matéria orgânica carregada junto com as penas e patas das aves, sendo estabilizada posteriormente, mantendo-se entre 10^3 a 10^5 , devido principalmente a ação do calor da água de escaldagem. Assim, também se padronizou a temperatura de coleta da água, a 58°C , com variação de $\pm 2^{\circ}\text{C}$, a fim de que se pudessem ter os fatores matéria orgânica e temperatura mais similares entre as coletas, pois são fatores que interferem na carga microbiana da água de escaldagem de frangos em matadouros-frigoríficos.



S/T = Amostra de água de escalda sem o produtoTIMSEN®
 C/T = Amostra de água de escalda com o produtoTIMSEN®
 UFC = Unidade Formadora de Colônias

Figura 23 - Contagens de microrganismos mesófilos aeróbios em água de escaldagem em 4 coletas em três abatedouros de aves no sul do Rio Grande do Sul.

Na tabela 3 são apresentadas as contagens de mesófilos aeróbios em água de pré-resfriamento de frangos, antes e após a adição de TIMSEN®, realizado em quatro coletas em três plantas processadoras de frangos localizadas no sul do Rio Grande do Sul.

Tabela 3 - Contagem de mesófilos aeróbios em água de pré-resfriamento de frangos, antes e após a adição de TIMSEN®.

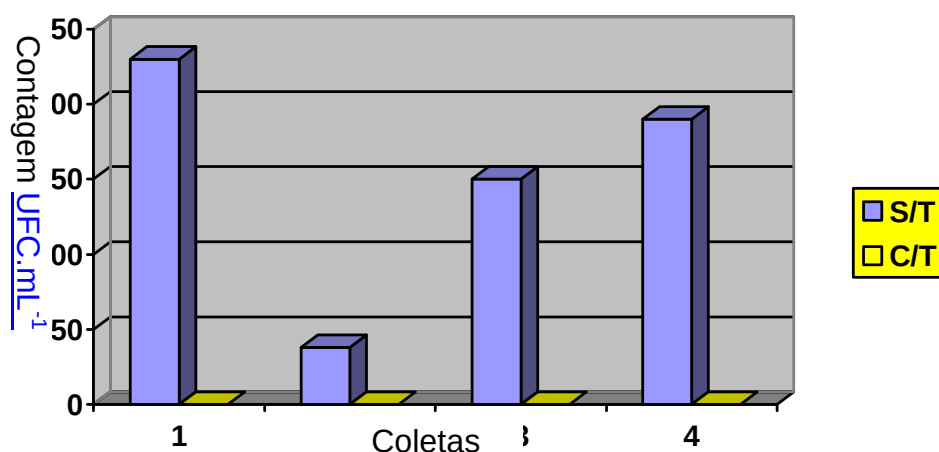
Abatedouros		Diluição			UFC.mL-1
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	
Coleta n.º 1 – S/T	A	+250	212	11	2,1x10 ¹
Coleta n.º 1 – CT	A	0	0	0	0
Coleta n.º 2 – S/T	B	+250	34	0	3,4x10 ¹
Coleta n.º 2 – CT	B	0	0	0	0
Coleta n.º 3 – S/T	B	+250	136	10	1,4x10 ¹
Coleta n.º 3 – CT	B	0	0	0	0
Coleta n.º 4 – S/T	C	+250	172	8	1,8x10 ¹
Coleta n.º 4 – CT	C	0	0	0	0

S/T = Amostra de água sem o produto TIMSEN®

C/T = Amostra de água com o produto TIMSEN®

A – Planta A – primeira coleta B – Planta B – segunda e terceiras coletas C – Planda C – Quarta coleta

Em todas as coletas, nas diferentes plantas observou-se uma redução considerável na contagem de microrganismos mesófilos aeróbios, sendo de forma constante a redução de 2 ciclos log. Observou-se que, a partir da diluição 10⁻² não ocorreu mais crescimento, e quando foi usado o produto TIMSEN® a redução foi praticamente total, não se evidenciando mais contagens (Figura 24).



S/T = Amostra de água sem o produto TIMSEN® C/T = Amostra de água com o produto TIMSEN®

Figura 24 - Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios na água de pré-resfriamento (*chiller*).

Ambos os experimentos, tanto com água de escaldagem de frangos, quanto com água de pré-resfriamento, demonstraram que houve redução na contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (Tabela 2 e 3). É importante destacar que uma alta contagem desses microrganismos num alimento indica a possibilidade de uma deterioração mais rápida dos produtos, diminuindo substancialmente sua vida útil.

Este estudo demonstrou inicialmente e revisão quais as etapas do processamento onde as aves podem se contaminar de forma como contaminação cruzada (Quadro 1). Sendo as mais importantes a escaldagem e pré-resfriamento, então o uso de um antimicrobiano nestas etapas contribui para que tenhamos um produto de melhor qualidade segundo aspectos microbiológicos.

4.2 Efeito do TIMSEN[®] sobre microrganismos mesófilos aeróbios nas amostras de frangos

Na tab. 4 se demonstra a contagem de microrganismos mesófilos aeróbios em carcaças de frangos nas etapas antes da escaldagem, após a escaldagem e após o pré-resfriamento (*chiller*), sendo que foram amostrados frangos sempre antes e após a adição do produto TIMSEN[®].

Tabela 4 - Contagem de microrganismos mesófilos aeróbios em carcaças de frango nas etapas de escaldagem e de pré-resfriamento (*chiller*), antes e após a adição de TIMSEN®. UFC.g⁻¹

Amostras	1ª - Coleta	2ª - Coleta	3ª - Coleta	4ª - Coleta
AE1	6,3x10 ⁴	4,4x10 ⁵	3,6x10 ⁵	1,6x10 ⁶
AE2	6,4x10 ⁴	3,6x10 ⁵	1,8x10 ⁵	2,8x10 ⁶
AE3	1,7x10 ⁴	8,1x10 ⁵	2,9x10 ⁵	3,4x10 ⁶
AE1 – T	3,3x10 ⁴	7,4x10 ⁵	2,2x10 ⁵	1,8x10 ⁶
AE2 – T	1,3x10 ⁴	2,5x10 ⁶	3,1x10 ⁵	1,1x10 ⁶
AE3 – T	1,4x10 ⁴	5,9x10 ⁵	4,5x10 ⁵	1,1x10 ⁶
PE1	4,9x10 ²	6,0x10 ³	2,1x10 ³	2,1x10 ⁴
PE2	6,6x10 ²	4,6x10 ⁴	2,3x10 ³	2,5x10 ⁴
PE3	6,9x10 ²	5,5x10 ³	3,1x10 ³	9,6x10 ⁴
PE1 – T	0	3,7x10 ¹	1,6x10 ³	0
PE2 – T	0	8	1,2x10 ³	0
PE3 – T	3	2,2x10 ¹	1,1x10 ³	0
PC2	1,6x10 ³	2,9x10 ³	6,2x10 ²	7,9x10 ²
PC1	1,3x10 ³	5,7x10 ³	2,9x10 ²	3,2x10 ²
PC3	9,4x10 ¹	9,5x10 ²	1,3x10 ³	4,0x10 ²
PC1 – T	6,0x10 ¹	0	2	0
PC2 – T	2,6x10 ¹	0	8	1,1x10 ²
PC3 – T	0	0	0	0

AE1 – Primeira amostra coletada antes da escalda, AE2 – Segunda amostra coletada antes da escalda, AE3 – Terceira amostra coletada antes da escalda, AE1-T - Primeira amostra coletada antes da escalda com TIMSEN, AE2 T Segunda amostra coletada antes da escalda com TIMSEN, AE3-T – Terceira amostra coletada antes da escalda com TIMSEN, PE1 – Primeira amostra coletada pós-escalda, PE2 – Segunda amostra coletada pós-escalda, PE3 – Terceira amostra coletada pós-escalda, PE1-T – Primeira amostra coletada pós-escalda com TIMSEN, PE2-T – Segunda amostra coletada pós-escalda com TIMSEN, PE3 T – Terceira amostra coletada pós-escalda com TIMSEN, PC1 – Primeira amostra coletada pós-chiller, PC2 – Segunda amostra coletada pós-chiller, PC3 – Terceira amostra coletada pós-chiller, PC1-T – Primeira amostra coletada pós-chiller com TIMSEN, PC2-T – Segunda amostra coletada pós-chiller com TIMSEN, PC3-T – Terceira amostra coletada pós-chiller com TIMSEN.

Observou-se redução significativa destes microrganismos nas carcaças de frango quando houve adição de TIMSEN®, tanto na escaldagem, quanto no pré-resfriamento (tab. 4). Observou-se, também, que a água de escaldagem, por si só, ocasionou uma redução média de 2 ciclos log, porém, a adição do produto TIMSEN®

ocasionou a redução de em média mais 2 ciclos log. Em alguns casos, como na quarta coleta na Planta 3 quando se compara a contagem de mesófilos aeróbios antes e após a adição do TIMSEN[®], verifica-se que houve redução de 4 ciclos log. Já na terceira coleta na Planta nº 2, onde devido a problemas de operacionalização (fluxo de abate e necessidade da empresa de não poder esperar os 20 minutos de contato com o produto), não foi possível deixar o produto agir pelo tempo necessário, não se verificou redução na contagem desses microrganismos. Esses resultados são impactantes porque a tendência atual em é de se utilizar obstáculos antimicrobianos atuando de forma sinérgica no controle de microrganismos deteriorantes e patogênicos.

Geralmente aplicam-se os antimicrobianos (cloro, dióxido de cloro, ozônio e cloreto de sódio acidificado), como solução aquosa, resultando numa redução de 2-4 log de patógenos, dependendo da concentração, temperatura de aplicação e tempo de contato (Pohlman *et al.* 2002a,b; Ransom *et al.* 2003; Stivarius *et al.* 2002)

A literatura já cita que a combinação de dois ou mais tratamentos de intervenção antimicrobiana em doses mais baixas pode atuar de forma sinérgica. Atacando frentes múltiplas, pode-se efetivamente reduzir os patógenos, mas se mantém a qualidade do alimento usando tratamentos individuais mínimos (NAM; AHN, 2003; SAMELIS *et al.*, 2002; SOMMERS, 2002; HUFFMAN, 2002). Citados por Sánchez-Plata (2007). Combinações de intervenções (por exemplo: tratamento com ácidos orgânicos e água quente ou vapor) podem não somente aumentar a eficácia, mas também servem para diminuir o impacto negativo na qualidade dos produtos de carne, resultando em produtos mais estáveis.

Outro aspecto relevante, é que a contagem desses microrganismos indica a qualidade higiênica do alimento, o que do ponto de vista econômico tem grande importância, haja vista que reflete na qualidade do produto, bem como em sua vida útil. Além disso, um menor número de microrganismos mesófilos também tem impacto na saúde pública, pois a grande maioria dos patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos, são mesófilos.

A presença de bactérias nos alimentos, além de favorecer a deterioração e/ou redução da vida útil desses produtos, possibilita a veiculação de patógenos, acarretando potenciais riscos à saúde do consumidor. Assim, a higiene correta dos alimentos é necessária para garantir a segurança e a sua salubridade e todos os

estágios de sua elaboração até o produto final, minimizando a preocupação para a saúde pública (CORTEZ, 2003).

Nos três estabelecimentos a contagem inicial de microrganismos nas carcaças foi elevada (10^5). Após a escaldagem, verificou-se redução de 2 log, entretanto, após a passagem das carcaças pela água de pré-resfriamento não houve redução significativa e, em alguns casos, houve até aumento do número de microrganismos. Entretanto, após a adição de TIMSEN[®], tanto na água de escaldagem, quanto na água do chiller, a redução no número de microrganismos foi bastante significativa, do ponto de vista microbiológico reduzindo em até 4 log, o que nos dá perspectivas de maior período de vida útil deste produtos.

4.3 Efeito do TIMSEN[®] sobre coliformes termotolerantes nas amostras de frangos

A tab. 5, procura demonstrar a contagem de coliformes termotolerantes em carcaças de frangos, frangos estes amostados em três plantas de processamento de aves realizados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Estes frangos foram amostrados antes da escalda, após a escalda e após o pré-resfriamento, sendo coletados antes e após a adição do produto Timsen[®].

Tabela 5 - Contagem de coliformes termotolerantes em 3 abatedouros de aves no sul do Rio Grande do Sul. UFC.g⁻¹

Amostras	1ª Coleta	2ª Coleta	3ª Coleta	4ª Coleta
AE1	1,6x10 ²	1,3x10 ³	4,2x10 ³	4,8x10 ³
AE2	1,3x10 ²	4,5x10 ³	4,1x10 ⁴	8,6x10 ³
AE3	1,1x10 ²	1,6x10 ³	1,4x10 ⁴	1,2x10 ⁴
AE1-T	3,3x10 ³	2,7x10 ³	7,7x10 ³	2,3x10 ⁴
AE2-T	1,5x10 ²	4,5x10 ³	1,6x10 ³	1,3x10 ⁴
AE3-T	2,0x10 ²	3,4x10 ³	4,1x10 ³	3,5x10 ³
PE1	9,2x10 ¹	2,3x10 ¹	2,9x10 ³	1,1x10 ²
PE2	1,1x10 ¹	9,1x10 ²	3,3x10 ²	9,0x10 ¹
PE3	8,0x10 ¹	4,1x10 ²	4,5x10 ²	4,8x10 ¹
PE1 – T	0	0	2,0x10 ²	0
PE2 – T	0	0	6,1x10 ²	0
PE3 – T	0	0	9,0x10 ²	0
PC2	3,6x10 ¹	3,0x10 ³	3,3x10 ¹	3,6x10 ¹
PC1	3,3x10 ¹	2,5x10 ³	4,6x10 ²	2,5x10 ²
PC3	1,0x10 ¹	7,4x10 ²	1,3x10 ²	8,8x10 ¹
PC1 – T	0	0	0	0
PC2 – T	0	0	0	0
PC3 – T	0	0	0	0

AE1 – Primeira amostra coletada antes da escalda, AE2 – Segunda amostra coletada antes da escalda, AE3 – Terceira amostra coletada antes da escalda, AE1-T - Primeira amostra coletada antes da escalda com TIMSEN[®], AE2 T Segunda amostra coletada antes da escalda com TIMSEN[®], AE3-T – Terceira amostra coletada antes da escalda com TIMSEN[®], PE1 – Primeira amostra coletada pós-escalda, PE2 – Segunda amostra coletada pós-escalda, PE3 – Terceira amostra coletada pós-escalda, PE1-T – Primeira amostra coletada pós-escalda com TIMSEN[®], PE2-T – Segunda amostra coletada pós-escalda com TIMSEN[®], PE3 T – Terceira amostra coletada pós-escalda com TIMSEN[®], PC1 – Primeira amostra coletada pós-chiller, PC2 – Segunda amostra coletada pós-chiller, PC3 – Terceira amostra coletada pós-chiller, PC1-T – Primeira amostra coletada pós-chiller com TIMSEN[®], PC2-T – Segunda amostra coletada pós-chiller com TIMSEN[®], PC3-T – Terceira amostra coletada pós-chiller com TIMSEN[®].

Observa-se que a contagem de coliformes termotolerantes na água de escalda foi elevada antes da utilização TIMSEN[®], entretanto, com a utilização do produto, houve uma redução considerável, quase baixando a zero os níveis de contaminação por esses microrganismos.

O processo de escaldagem em si reduziu, mas não eliminou a população de coliformes termotolerantes, porém, quando se adicionou o produto TIMSEN[®], e foi possível aguardar o tempo de contato necessário, a redução foi praticamente total, não mais se evidenciando esses microrganismos. Já na terceira coleta na planta nº 2, na qual não foi possível aguardar o tempo necessário, os resultados não foram satisfatórios e praticamente não houve redução quando se comparou as amostragens antes e após a escalda sem a adição de TIMSEN[®].

A avaliação da presença de coliformes termotolerantes nos alimentos é de grande importância para a indicação de contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo pós-processamento. Segundo FRANCO (2005), os microorganismos indicadores são grupos ou espécies que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial de um alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento

4.4 Efeito do TIMSEN[®] sobre *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* nas amostras de frangos

A tab. 6 demonstra os pontos amostrados e os resultados com relação ao isolamento e caracterização das espécies de *Listeria* spp. Em três abatedouros de frangos onde se realizou quatro coletas, sendo amostrados frangos antes da escalda, após a escalda e após o pré-resfriamento e sempre antes e após a adição do produto TIMSEM[®].

Tabela 6 - Pontos amostrados onde houve ocorrência de *Listeria*.

Abatedouros				
Coletas				
Ponto amostrado	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
AE1	<i>L.monocytogenes</i> <i>L.seeligeri</i>	nc	nc	nc
AE2	nc	nc	nc	nc
AE3	nc	nc	nc	nc
AE1-T	nc	nc	nc	nc
AE2-T	nc	nc	nc	nc
AE3-T	nc	nc	nc	nc
PE1	nc	nc	<i>L.inocua</i>	nc
PE2	nc	nc	nc	nc
PE3	nc	nc	<i>L.inocua</i>	<i>L.inocua</i>
PE1-T	nc	nc	nc	nc
PE2-T	nc	nc	nc	nc
PE3-T	nc	nc	nc	nc
PC1	<i>L.monocytogenes</i> <i>L.seeligeri</i>	nc	nc	nc
PC2	nc	nc	nc	nc
PC3	nc	nc	nc	<i>L.inocua</i>
PC1-T	nc	nc	nc	nc
PC2-T	nc	nc	nc	nc
PC3-T	nc	nc	nc	nc

Nc = não houve crescimento.

AE1 – Primeira amostra coletada antes da escalda, AE2 – Segunda amostra coletada antes da escalda, AE3 – Terceira amostra coletada antes da escalda, AE1-T - Primeira amostra coletada antes da escalda com TIMSEN®, AE2 T Segunda amostra coletada antes da escalda com TIMSEN®, AE3-T – Terceira amostra coletada antes da escalda com TIMSEN®, PE1 – Primeira amostra coletada pós-escalda, PE2 – Segunda amostra coletada pós-escalda, PE3 – Terceira amostra coletada pós-escalda, PE1-T – Primeira amostra coletada pós-escalda com TIMSEN®, PE2-T – Segunda amostra coletada pós-escalda com TIMSEN®, PE3 T – Terceira amostra coletada pós-escalda com TIMSEN®, PC1 – Primeira amostra coletada pós-chiller, PC2 – Segunda amostra coletada pós-chiller, PC3 – Terceira amostra coletada pós-chiller, PC1-T – Primeira amostra coletada pós-chiller com TIMSEN®, PC2-T – Segunda amostra coletada pós-chiller com TIMSEN®, PC3-T – Terceira amostra coletada pós-chiller com TIMSEN®.

Das 72 amostras de carcaças de frangos analisadas, em 6 (8,33%) houve presença de *Listeria* spp, isoladas nos três estabelecimentos estudados (100%), quando se analisa as coletas das 4 coletas realizadas foi isolado *Listéria* spp. em três coletas (75%). *Listeria monocytogenes* foi isolada em 2 amostras do mesmo abatedouro, coletadas antes da escalda e pós-resfriamento.

Dias (2009), avaliou 178 amostras em matadouro de frangos em São Paulo, observando que 28 (15,7%) apresentaram *L. monocytogenes*. Destas, 12 (43%) foram isoladas de superfícies sem contato com o produto (pisos da sala de evisceração, sala de corte e da câmara fria, parede de carrinho da sala de corte, ralo da câmara fria), nove (34%) de superfícies de contato com o produto (caixas brancas, esteira, tesoura, gancho da nórea), e sete (25%) de carcaças de frango resfriadas.

Neste estudo, em duas amostras controle, sem adição do TIMSEN[®], detectou-se a presença simultânea de mais de uma espécie de *Listeria*. Uma das amostras foi coletada antes da escalda, isolando-se *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* e, interessante, quando essa mesma carcaça foi coletada após a passagem pelo pré-resfriamento, as mesmas espécies foram recuperadas.

A presença de duas espécies diferentes de *Listeria* em um mesmo ponto tem sido relatada na literatura e isso se deve ao fato de todas as bactérias desse gênero apresentaram necessidades fisiológicas e de crescimento semelhantes, bem como, compartilharem os mesmos nichos ecológicos. Devido a isso, mesmo que apenas *L. monocytogenes* seja patogênica para humanos, a presença das outras espécies em um alimento serve como um indicador da sua possível presença.

Em nenhuma das carcaças que foram submetidas ao TIMSEN[®] houve presença de *Listeria* spp., o que é um resultado extremamente relevante do ponto de vista de saúde pública. Para comprovar a ação do produto sobre esse importante patógeno, foi realizado um ensaio *in vitro* (teste de eficiência de sanitizantes), de forma a testar a efetividade do TIMSEN[®] frente a *L. monocytogenes*. Esse teste foi realizado no Laboratório da UNIVATES (Universidade Vale do Taquari de Ensino Superior), utilizando como referência a Portaria N.º 101, de 11 de agosto de 1993, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, utilizando cepas de *L. monocytogenes* 4a ATCC 19114 (em anexo). Os testes foram realizados procurando simular as condições de abate que estávamos estudando, ou seja, principalmente temperatura e matéria-orgânica. Da mesma forma que no experimento na indústria,

o teste *in vitro* demonstrou a efetividade do TIMSEN[®] sobre o patógeno, mesmo em condições adversas do meio ao qual foi submetido.

É interessante frisar que diversos autores têm encontrado alta prevalência de cepas de *L. monocytogenes* resistentes à cefaclor (100%), penicilina (100%), oxacilina (100%), clindamicina (100%), cloranfenicol (100%), ampicilina (85,7%) e ciprofloxacina (71,4%) e têm verificado um aumento na resistência desses microrganismos à antibióticos (SAFDAR e ARMSTRONG, 2003 ; ZHANG et. al, 2007; PESAVENTO et al. 2010). O uso indiscriminado de antimicrobianos como promotores de crescimento em rações animais e quando empregados no tratamento de animais doentes e/ou como medida profilática, favorecem a presença desses resíduos nos alimentos, desencadeando a emergência da resistência bacteriana a antimicrobianos (PHILLIPS et al., 2004).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do trabalho foi alcançado, pois se procurou demonstrar que é possível diminuir a carga inicial de microrganismos patogênicos e não patogênicos da linha de abate, utilizando-se métodos químicos seguros, principalmente quando os processos de autocontrole (BPF, PPHO e APPCC), não são bem executados, pois, a saúde pública deverá prevalecer, através de uma segurança alimentar fornecendo alimentos seguros sanitariamente para o consumidor.

O autor deste trabalho sugere ainda que outros estudos sejam realizados com o produto principalmente visando à redução da quantidade de água necessária para abate principalmente de frangos por não necessitar de um volume tão grande para renovação constante dos tanques de escalda e de pré-chiller e chiller, pois a água tem se tornado cada vez mais escassa em regiões produtoras de frangos e onde estão instaladas as agroindústrias de beneficiamento.

Outro aspecto relevante que devemos enfocar é da possibilidade do surgimento de novos agentes com poderes de morbidade e mortalidade consideráveis, como recentemente o surgimento dos vírus H5N1 (influenza aviária) e H1N1 (influenza suína), que deixaram o setor primário perplexos, portanto não são desprezíveis estas possibilidades de termos como lançar mão em caráter de urgência ou emergência de alternativas que possam diminuir riscos.

O produto agiu em uma faixa de temperatura muito ampla de 4 a 60°C, comprovando as indicações do fabricante.

6 CONCLUSÕES

O produto TIMSEN® é eficiente na redução de microrganismos mesófilos aeróbios e de coliformes termotolerantes na água de escaldagem e na água de pré-resfriamento em abatedouros de frangos.

Com relação a diminuição desses indicadores nas carcaças de frangos após as etapas de escaldagem e pré-resfriamento, o produto também é eficiente.

TIMSEN® é eficiente no controle de *L. monocytogenes* em carcaças de frango após as etapas de escaldagem e pré-resfriamento.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, R. R. **Uma experiência de aplicação do Sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) em uma indústria de laticínios.** Florianópolis, 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Programa de Pós Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina.
- AGUADO, V.; VITAS, A. I.; GARCÍA-JALON, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p.341-347, 2004.
- AGUADO, V.; VITAS, A. I.; GARCÍA-JALON, I. Random Amplified Polymorphic DNA typing applied to study of cross-contamination by *Listeria monocytogenes* in processed food products. **Journal of Food Protection**, v.64, n.5, p.716-720, 2001.
- ALFREDO, M. T. **APPCC no gerenciamento da qualidade em abatedouros de frangos.** 2006. 163f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Produção e Gestão Agroindustrial, Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande.
- ALMEIDA, A. A. P. Garantia de qualidade em laticínios:uma abordagem atual. **Qualidade em Dia**, São Paulo, n.18, jul./ago./set. 2001.
- ALMEIDA, P. F. et al. *Listeria monocytogenes*:importância e distribuição nos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.64. p.19-23, 1999.
- ANDRIGHETO, C. **Disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha de produção de “nuggets” congelados de frango.** São Paulo, 2000, 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ANONYMOUS. **Update: multistate outbreak of listeriosis** – United States, 1998-1999. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 47: 1117-1118. 1999.
- ANTONIOLO, P. C. ***Listeria* spp. em ovinos e carcaças ovinas em nível de abatedouro.** Pelotas, 2001. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- ANTONIOLO, P. C.; BANDEIRA, F. S.; JANTZEN, M. M.; DUVAL, E. H.; SILVA, W. Prevalence of *Listeria* spp. in feces and carcasses at a lamb packing plant in Brazil. **Journal of Food Protection**. v.66, n.2, p.328-330, 2003.

ANVISA. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Resolução RDC no 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>>. Acesso em: 11 nov. 2008.

APHA. **Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods**, 4rd.ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 2001.

ARAUJO, P. C. C.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C. A. P. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ-Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.30, n.1, p.19-25, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS – ABEF. **Relatório Anual 2006**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/Relatorios_Anuais.php>. Acesso em: 16 dez. 2007.

AUTIO, T.; SÄTERI, T.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; RAHKIO, M., LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v.63, n.10, p.1438-1442, 2000.

BAILEY, J. S. Control of Salmonella and Campylobacter in poultry production: a summary of work at Russel Research Center. **Poultry Science**, v.72:1169-1173, 1993.

BAILEY, J. S.; J. E. Thomson COX, N. A. Contamination of poultry during processing, p. 193-206. In F. E. Cunningham and N. A. Cox (ed.). *The microbiology of poultry meat products*. Academic Press Inc.; New York, 1987.

BARBALHO, T. C. F.; ALMEIDA, P. F.; ALMEIDA, R. C. C.; HOFER, E. Prevalence of *Listeria* spp. et a poultry processing plant in Brasil and a phage test for rapid confirmation of suspect. **Food Control**, n.16, p.211-216, 2005.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Listeria**: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Zaragoza (España): Acribia, 1998. 173p.

BERENDS, B.R.; KNAPEN, F.; MOSSEL, D.A.A.; BURT S.A.; SNIJDERS, J.M.A. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in the Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies. **Int. J. Food Microbiol.**, 44(3):219-229, 1998.

BENNET, W. L.; STEED, L. L. **An integrated approach to food safety**. Quality Press, vol. 32, February, 1999.

BERSOT, L. S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**, v.57, p.13-17, 2001.

BESSE, N. G. Influence of various environmental parameters and of detection procedures on the recovery of stressed *L. monocytogenes*: a review. **Food Microbiology**, 2002, 19, 221-234.

BLANKENSHIP, L. C.; Cox, N. A.; CRAVEN, S. E.; MERCURI, A. J.; WILSON, R. L. Comparison of the microbiological quality of inspection-passed and fecal contamination-condemned broiler carcasses. **Journal of Food Science**, v.40:1236, 1975.

BOARD, R. G. **Introducción a la microbiología moderna de los alimentos**. Espanha: Acribia, 1988. 271p.

BORGES, M. F.; SIQUEIRA, R. S.; BITTENCOURT, A. M.; VANETTI, M. C. D.; GOMIDE, L. A. M. Occurrence of *L. monocytogenes* in salami. **Revista de Microbiologia**, v.30, n.4, 1999.

BRANCO, M. A. A. C. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **B. CEPPA**, Curitiba, v.21, n.2. p.393-408, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higienico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 nov. 1998. Seção 1, p.226. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1129>>. (1998b)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 46 de 10 de fevereiro de 1998. Manual genérico de procedimentos para APPCC em indústrias de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 mar. 1998. Seção 1, p. 24-28. (1998a)

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa Nº. 42 de 22 de Novembro de 1999. Programa Nacional de Resíduos em Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 fev. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 12**, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. (2001)

BRASIL. PORTARIA 368,4 de setembro de 1997. O MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higienico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 set. 1997.

BRASIL. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo decreto nº 30.691, de 29/03/52, alterado pelos decretos nº 1.255, de 25/06/62, nº 1.236, de 02/09/94, nº 1.812, de 08/02/96 e nº 2.244, de 04/06/97. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 jun. 1997. Seção I, p. 11555-11558. (1997).

Byrd, J. A., 1999. Origin and relationship of *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of poultry during processing. Poultry Science 1999 Annual Meeting. *Campylobacter Symposium Abstract #15*.

BYUN, S. K.; JUNG, S. C.; YOO, H. S. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p.227-235, 2001.

CASON, J. A. et al. Carcass microbiological quality following intermittent scalding and defeathering. **Journal of Applied Poultry**, r.8, p.368-373, 1997.

CASON, J. A.; BAILEY, J. S.; STERN, N. J.; WHITTEMORE, A. D.; COX, N. A. Relationship between aerobic bacteria, salmonellae, and *Campylobacter* on broiler carcasses. **Poultry Science**, v. 76:1037-1041, 1997.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Listeriosis. Division of bacterial and mycotic disease. October, 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm>. Acesso em:21 jan. 2006.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Division of bacterial and mycotic diseases**. Disponível em:

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Public Health Dispatch**: Outbreak of Listeriosis – Northeastern United States, 2002. Disponível em:

CHARLEBOIS, R.; TENDEL, R.; MESSIER, S. Contaminação da superfície de carcaças bovinas com coliformes fecais. **Journal of Food Protection**, Ames, v.54, n.2, p.950-956, 1991.

CHOI, Y. C.; CHO, S. Y.; PARK, B. K.; CHUNG, D. H.; OH, D. H. Incidence and characterization of *Listeria* spp. from Foods Available in Korea. **Journal of Food Protection**, v.64, n.4, p.554-558, 2001.

COELHO, C. P., GOMIDE, L. A., PASSOS, F. J. V., VANETTI, M. C. D., BORGES, M. F., SIQUEIRA, R. S., MENDONÇA, R. C. S. Efeito, *in vitro*, de glicose e cloreto de sódio sobre *Listeria* spp. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16, 15-17 Jul. 1998a, Rio de Janeiro – RJ. **Anais...** Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. v.2, p.885-888.

COLOMBO, S. S. **Qualidade**:sua parceira no sucesso. **Nutrição em Pauta**, mai./jun., 1999. Disponível em: <<http://www.nutricaoempauta.com.br/novo/36/foodservice.html>>.

SÁNCHEZ-PLATA, M. X. Intervenciones Antimicrobianas en el Processamiento de Aves. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 20., 2007, PORTO ALEGRE. **Anais do XX Congresso Latinoamericano de Avicultura**, Porto Alegre, p. 272-294, 2007.

CORTEZ, A.L.L. Indicadores de qualidade higiênico-sanitária em lingüiça fresca comercializada no Município de Jaboticabal- SP. 2003. 42p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.

COX, J. E.; MERCURI, A. J.; TANNER, D. A.; CARSON, M. O.; THOMPSON, J. E. BAILEY, M. S. Effectiveness of sampling methods for Salmonella detection on processed broilers. **Journal of Food Protection**, v.41:341-343, 1974.

COX, N. A.; BAILEY, J. S. Survival of Salmonella typhimurium in carcass processing water samples. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 4:154-156, 1995.

COX, N. A.; BAILEY, J. S.; RYSER, E. T. Incidence an behavior of *L. monocytogenes* in poultry and egg products. In: RYSER, E. T.; MARTH, E. H., eds. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1991. 738pg.

D'ANGELIS, C. E. M. *et al.* 2004. Levantamento de *Listeria monocytogenes* em leite tipo UHT e tipo C. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n. 120. p. 45-49.

DEDIOL, C., NACIF, N. J., ANDRÉ, S., SÁNCHEZ, M. L., ACOSTA, M. V., SFREDDO, S. E. Incidência de *Listeria monocytogenes* em carne vacuna fresca en el área del gran Mendoza. **Higiene Alimentar**. v.16, n.102/103, p.13-16, 2002.

DELAZARI, I. Programas de segurança de alimentos na indústria de produtos avícolas. In:CONFERÊNCIA APINCO 2003 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, In:**Anais da...** Campinas:FACTA, 2003. p.123-126.

DEMMING, M. S.; TAUXE, R. V.; BLAKE, P. A.; DIXON, S. E.; FOWLER, B. S.; JONES, S.; LOCKAMY, E. A.; PATTON, C. M.; SIKES, R. O. Campylobacter enteritis at a university:transmission from eating chicken and from cats. **American Journal of Epidemiology**, v.126:526-534, 1987.

DESTRO, M. T. **Isolamento de *Listeria* spp. e estudo de sua ocorrência em carnes, leite e derivados**. Campinas, 1990. 73f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

DESTRO, M. T. ***Listeria monocytogenes* em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processadora de pescado**. São Paulo, 1995. 142f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

DHANASHREE, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; GOEBEL, W. Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, India. **Food Microbiology**, v.20, p.447-453, 2003.

DICKEL, E. L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* spp. em carcaças de frango para o controle higiêncio-sanitário do processo de abate.** 2004. 133f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

DUFFY, G.; WALSH, D.; SHERIDAN, J. J.; LOGUE, C. M.; HARRINGTON, D.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua* during storage of minced beef under vacuum or in air at 0°C and 10°C. **Food Microbiology**, v.17, p.571-578, 2000.

FAO. Food Quality and Safety Systems. **A training manual on food hygiene and the Hazard Analysis and Critical Control Point System.** Rome: FAO,1998.

FARBER, J. M., WARBURTON, D. W., BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. **Government of Canada – HBP Method**, Quebec (Canadá): Polyscience Publications, Sep. 1994.

FARBER, J. M.; ADDISON, C. J. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, n.3, p.242-250, 1994.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, sept. 1991, vol. 55, n.3, p.476-511.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Review**, v.55, n.3, p.476-511, 1991.

FENLON, D. R.; WILSON, J.; DONACHIE, W. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, n.6, p.641-650, 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998, 220p.

FIGUEIREDO, E. A. P. **Avicultura de corte ou de postura?** Disponível em:<<http://www.bichoonline.com.br/artigos/embrapave0003.htm>>. Acesso em:17 jan. 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA Bacteriological Analytical Manual, 7th ed. Washington, D. C.: AOAC Int., 1992.

FOOD SAFETY AN INSPECTION SERVICE. Washington DC. **Pathogens reduction and HACCP system and beyond.** Disponível em: <<http://www.usda.gov/agency/fsis/bkbeyond.htm>>. (1998).

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar.** Porto Alegre:Artmed, 2002. 424p.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Trad. Maria carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt. Porto Alegre:Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 184, 2002.

FRANCO, Bernadette D. G. M; LANDGRAF, Mariza; DESTRO, Maria Tereza. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. p27-171.

GAMA, N. M. S. Laringotraqueíte:o caso brasileiro. In:CONFERÊNCIA APINCO 2004 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. 2004, Santos. **Anais da...** Santos: FACTA, 2004, p. 85-92.

GARDNER, F. A.; GOLAN,F. A. Water usage in poultry processing-an effective mechanism for bacterial reduction. Pages 338-355 in Porc. of the 7TH NATL. SYMP. On Food Process. Wastes. Environ. Prot. Technol. Series. EPA-600/2-76-340. Environ. Prot. Agency. Cincinnati, OH, 1976.

GENIGEORGIS, C. A importância do *Campylobacter* na avicultura. *Avicultura Industrial*, p. 6-12, agosto, 1986.

GENIGEORGIS, C. A.; DUTUFLESCU, D.; GARAYZABAL, J. F. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. **Journal of Food Protection**, v.52, n.9, p. 618-624, 1989.

GENIGEORGIS, C. M.; HASSUNEH; COLLINS, P. *Campylobacter jejuni* infection on poultry farms and its effect on poultry meat contamination during slaughtering. **J. Food Protection**, 49:895?903, 1986.

GIOVA, T. A. **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo:Varela, 1997. 375p.

GRAVESEN, A.; JACOBSEN, T. MÜLLER, P. L.; HANSEN, F.; LARSEN, A. G.; KNOCHEL, S. Genotyping of *Listeria monocytogenes* comparison of RAPD, ITS, and PFGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p.43-51, 2000.

GROSSKLAUS, D.; LESSING, G. Problems of hygiene in poultry slaughterhouse. **Die Fleischwirtschaft**, v.44:1253, 1994.

GUDBJORNSDOTTIR, B.; SUIHKO, M. L.; GUSTAVSSON, P.; THORKELSSON, G.; SALO, S.; SJOBERG, A. M.; NICLASSEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiology**, v.21, p.217-225, 2004.

GUIA PARA ELABORAÇÃO DO PLANO APPCC; CARNES E DERIVADOS. 2.ed. Brasília, SENAI/DN, 2000. 142 p. (Série Qualidade e Segurança Alimentar). Projeto APPCC Indústria. Convênio CNI/SENAI/SEBRAE

HAJDENWURCEL, J. R. **Atlas de microbiologia dos alimentos**. São Paulo:Fonte, 1998. 66p.

HARRIS, N. V.; THOMPSON, D.; MARTIN, D. C. and NOLAN, C. M. A survey of *Campylobacter* and other bacterial contaminants of pre-market chicken and retail poultry and meats. **American Journal of Public Health**, v.76:401-406, 1986.

HAYES, P. L. M.; GRAVES, B.; SWAMINATHAN, G. W.; AJELLO, G. B.; MALCOM, R. E.; WEAVER, R.; RANSOM, K.; DEEVER, B. D.; PLIKAYTIS, A.; SCHUCHAT, J.; WENGER, R. W.; PINNER, C. V. Broome, and the *Listeria* Study Group. Comparison of three selective methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. **Journal of Food Protection**, v.55, p. 952-959, 1992.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R. S.; OLIVEIRA, M. A. Meningite por *L. monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.173-177, 1998.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9.ed. Baltimore:Williams & Wilkins, 1994.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HOUSTON, D. L. An overview of US Department of Agriculture requirements. **Poultry Sci.**, 64:481-484, 1985.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, n.11, p.2465-2466, 1988.

ICMSF. *Listeria monocytogenes*. In:**Microrganisms in foods 5**:microbiological specification of food pathogens. London: Chapman & Hallp. p.141-182, 1996.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microrganisms in foods**: their significance and methods of enumeration. 2 ed. Toronto, University of Toronto, v.1, 1978. 434p.

IZAT, A. L.; F. A. GARDNER, J. H. DENTON, GOLAN, F. A. Incidence and level of *Campylobacter jejuni* in broiler processing. **Poultry Sci.**, 67:1568-1572, 1988.

JAMES, W. O.; WILLIAMS, W. O.; PRUCHA, J. C.; JOHNSTON, R.; CHRISTENSEN, W. Profile of selected bacterial counts and *Salmonella* prevalence on raw poultry in a poultry slaughter establishment. **J Am.Vet. Med. Ass.**, 200(1):57-59, 1992.

JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**. v.7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.

JAY, J. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo:ArtMed, 2005. 100p.

JEONG, D. K.; FRANK.; J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10⁰C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v.57, p.576-586, 1994.

JURAN, J. M. Qualidade no século XXI: Prognósticos para o futuro da qualidade e uma análise de sua história no século XX, marcado pela busca da produtividade. **HSM Management**, São Paulo, n.3, 1997.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**. v. 65, p.1811-1829, 2002.

KATHARIOU, S. **Pathogenesis determinants of *Listeria monocytogenes*:** Microbial foodborne diseases. In: CARY, J. W.; LINZ, J. E.; BHATNAGAR, D. Technomics Publishing Co. Lancaster, Pa. p. 295-314, 2000.

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p.167-174, 2004.

KERR, K. G.; KITE, P.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P. M. Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 609-613, 1995.

KNOOP, G. N.; PAMELEE, C. E.; ; STADELMAN, W. J. Microbiological characteristics of wet- and dry-chilled poultry. **Poultry Science**, v.50:530-536, 1971.

KWAK, W. S.; HUH, J. W.; McCASKEY, T. A. Effect of processing time on enteric bacteria survival and on temperature and chemical composition of broiler poultry litter processed by two methods. **Bioresource Technology**. v.14, n.96, p.1529-1536, 2005.

LACIAR, A. L.; CENTORBI, O. N. P. *Listeria* species in seafood: isolation and characterization of *Listeria* spp. from seafood in San Luis, Argentina. **Food Microbiology**, v.19, p.645-651, 2002.

LAER, A. E.; LIMA, A. S.; TRINDADE, P. S.; SILVA, W. P. Monitoramento de *Listeria monocytogenes* em planta de processamento de lingüiça mista frescal localizada em Pelotas (RS). **Revista Brasileira de Vigilância Sanitária**. v.1, n.3, 2005.

LAWRENCE, L. L. M.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in a poultry processing environmental and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.4600-4604, 1994.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P. A. D.; FLÈCHE-MATÉOS, A. L.; ROCHE, S. M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, doi:10.1099/ijs.0.017376-0, nov, 2009.

LILLARD, H. S. Factors affecting the persistence of Salmonella during processing of poultry. **Journal of Food Protection**, v.52:829-832, 1989.

LILLARD, H. S. Occurrence of *Clostridium perfringens* in broiler processing and further processing operations. **Journal of Food Science**, v.38:1008, 1971.

LILLARD, H. S. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.53, n.3, p.202-204, 1990.

LOPES, M. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouros de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.3, p.465-476, 2007.

MALLINSON, E. T. Salmonella monitoring system simplifies evaluation of farms. **Poultry Digest**, September. p.46-47, 1990.

MARTH, E. H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, v.42, p.165-168, 1988.

MARTINEZ, I.; RORVIK, L. M.; BROX, V.; LASSEN, J.; SEPPOLA, M.; GRAM, L.; VOGEL, B. F. Genetic variability among isolates of *L. monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 2634, p.1-13, 2002.

MATARAGAS, M.; DROSINOS, E. H.; METAXOPOULOS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *L. monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at $4 \pm 2^\circ\text{C}$. **Food Microbiology**, v.20, p.259-265, 2003.

MATILLA-SANDHOLM, T.; SKYTTE, E. The effect of spoilage flora on the growth of food pathogens in minced meat stored at chilled temperatures. **Lebensm-wiss-u Technology**, v.24, p 116-120, 1991.

MAY, K. N. Changes in microbial numbers during final washing and chilling of commercially slaughtered broilers. **Poultry Science**, v.53:1282, 1974.

MAZURIER, S.-I.; WERNARS, K. Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. **Research Microbiology**, Paris, v.143, p.499-505, 1992.

McEVOY, J. M.; DOHERTY, A. M.; SHERIDAN, J. J.; McGUIRE, L. The incidence of *Listeria* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 on beef carcasses. Proceedings 44 th ICoMST, p.346-347, Barcelona, Spain A43, 1999.

McLAUCHLIN, J.; JONES, D. *Erysipelothrix* and *Listeria*. In: Borrielo, S.P., Duerden, B. I. (Eds.), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed. **Systematic Bacteriology**, vol. 2. Update 1. CD Rom London, Arnold.

McWARD, G. W.; TAYLOR, D. R. Acidified clay litter amendment. **Journal Applied Poultry Research**, v.9, p.518-529, 2000.

MENDES, A. C. R. Os profissionais da área de alimentos no controle de qualidade: "uma reflexão sobre as ações necessárias para proteção da saúde do consumidor". **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.53, 1998.

NALERIO, E. S. **Aspectos epidemiológicos e moleculares de *Listeria spp.* e de *Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de aves do sul do Rio grande do Sul**. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

NORRUNG, B.; BUNCIC, S. Microbial safety of the meat in the European Union. **Meat Science**, v.78, p.14-24, 2007.

OLIVEIRA, M. C.; ALMEIDA, C. V.; ANDRADE, D. O.; RODRIGUES S. M. M. Teor de matéria seca, pH e amônia volatilizada da cama de frango tratada ou não com diferentes aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 4, n.32, p.824-829, 2003.

OOSTEROM, J.; NOTERMANS, S.; Karman, H.; ENGELS, G. B. Origin and prevalence of *Campylobacter jejuni* in poultry processing. **Journal of Food Protection**, v.46:339-344, 1983.

OPARA, O. O.; CARR, L. E.; RUSSEK-COHEN, E.; TATE, C. R.; MALLINSON, E. T.; MILLER, R. G.; STEWART, L. E.; JOHNSON, R. W.; JOSEPH, S. W. Correlation of water activity and other environmental conditions with repeated detection of contamination on poultry farms. **Avian Diseases**, v.36:664-671, 1992.

PEARSON, A. D.; GREENWOOD, M.; HEALING, T. D.; ROLLINS, D.; SHAHAMAT, M.; DONALDSON, J.; COLWELL, R. R. Colonization of broiler chickens by waterborne *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environment microbiology**, v.59:987-996, 1993.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DEGROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.23, p.28-52, 2004.

PUBLIC HEALTH DISPATCH: Outbreak of Listeriosis - Northeastern United States, 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5142a3.htm>>. Acesso em: 21 jun. 2003.

QUEVEDO, A. **Anuário 2005:frango à brasileira**. Disponível em:<http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12036etipo_tabela=negociosecategoria=mercado_interno->>. Acesso em:20 abr. 2005.

Rahkio, T. M. and Korkeala, H. J., 1997. Airborne bacteria and carcass contamination in slaughterhouses. *Journal of Food Protection* v. 60 (1): 38-42.

RIO GRANDE DO SUL. PORTARIA N.º211, de 05 de novembro de 2009 – SEAPPA. Estabelece as normas para implantação das Boas Práticas de Fabricação em todos os estabelecimentos registrados na Cispoa, substituindo a Portaria 267 de 06 de novembro de 2007. **Diário Oficial do Estado**, Porto Alegre, 04 nov. 2009.

RIO GRANDE DO SUL. RESOLUÇÃO N.º 20, de 22 de outubro de 2003, estabelece a obrigatoriedade de realização de análises microbiológicas e físico químicas de água e de produtos registrados na CISPOA. **Diário Oficial do Estado**, Porto Alegre, 03 nov. 2003.

Rigby, C. E. and Pettit, J. R., 1980. Changes in the Salmonella status of broiler chickens subjected to simulated shipping conditions. *Canadian Journal Comp. Medical* v.44: 374-381.

ROÇA, R.O.; SERRANO, M. A. Abate de bovinos: alterações microbianas da carcaça. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.9, n.35, p.8-12, 1995.

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. EDS. **Food microbiology**: Fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press, p.337- 352, 1997.

ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M. P, Beucaht, L. R. Montville, T. J. eds. **Food Microbiology Fundamental and Frontiers**, Washington:ASM Press, p.337-352, 1997.

SAMELIS, J.; METAXOPOULOS, J. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. **Food microbiology**, v.16, p.465-477, 1999.

SAMS, A. R. Poultry Processing and Products. **Encyclopedia of Agricultural Science**, v.3:433-440, 1994.

SANCHEZ, G. N.; RODRIGUES, R. M.; OLIVEIRA, P. R.; GARZA, L. M. Development of two Multiplex polymerase chain reaction for the detection of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v.66, n.6, p.1055-1062, 2002.

SÁNCHEZ; M. X.; FLUCKEY W. M.; BRASHEARS M. M.; MCKEE S. R. Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp and *Salmonella* spp in broilers processed in air-chill and immersion-chill environments. **Journal of Food Protection**, v.65, n.6:948-956, 2002.

SANDERS, D. H.; BLACKSHEAR, C. D. Effect of chlorination in the final washer on bacterial counts of broiler chicken carcasses. **Poultry Science**, v.50:215, 1971.

SANTIAGO, B. N. **Políticas públicas y derecho alimentario**. Del GATT a la OMC en Latinoamérica y el Caribe. Buenos Aires:Ciudad Argentina, 1998

SCHLECH, W. F. Overview of listeriosis. **Food Control**, Guildford, v. 7, n.4/5, p. 183-186, 1996.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology**. v.4, p.169-183. 1991.

SILVA, M. C. C. **Ocorrência de *Listeria* spp. em embutidos cárneos artesanais comercializados no mercado varejista da cidade de Contagem, MG.**

Contagem, 1996. 76f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SILVA, N. da; AMSTALDEN, V. C.; CANTUSIO NETO, R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Varela, 1997, p.31.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. A. C.; SILVEIRA, F. A. Métodos de análises microbiológica de alimentos. **Manual técnico ITAL**, Campinas, n.14, p.135-141, 2007.

SILVA, W. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite.** São Paulo, 1998. 95f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOULTOS, N. et al. Presence of *Listeria* and *Salmonella* spp. in retail chicken in Northern Ireland. **Letters in Applied Microbiology**, v.37, p.421-423, 2003.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the Food-Processing Environment. **Journal of Food Protection**, v.65, p. 709-725, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia.** 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.

TRAN, H. T.; KATHARIOU, S. Restriction fragment length polymorphisms detected with novel DNA probes differentiate among diverse lineages of serogroup 4 *Listeria monocytogenes* and Identify Four Distinct Lineages in Serotype 4b. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.59-64, 2002.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Meat and Poultry Inspection Regulations.** Animal and Plant Inspection Service Meat and Poultry Program. US Dept. Agric.; Washington D.C, 1973.

UNNERSTAD, H.; NILSSON, I.; ERICSSON, H.; DANIELSSON-THAM, M.-L.; BILLE, J.; BANNERMAN, E.; THAM, W. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2054-2056, 1999.

UYTTENDAELE, M. R.; NEYTS, K. D.; LIPS, R. M.; DEBEVERE, J. M. Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and products obtained from Belgium and French abattoirs. **Food microbiology**, v.14, p.339-345, 1997.

UYTTENDAELE, M.; TROY, P. de; DEBEVERE, J. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 62, n.7, p.735-740, jul. 1999.

VAN DEN ELZEN, A. M. G.; SNIJDERS, J. M. A. Critical points in meats production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Quarterly**, The Hage, v.15, n.4, p.143-145, 1993.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. **Food borne Pathogens**. USA: Mosby Year Book, 1991.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUES-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, n.3, p.584-640, July, 2001.

VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *L. monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p.349-356, 2004.

VOGEL, B. F.; JORGENSEN, L. V.; OENIYI, B.; HUSS, H. H.; GRAM, L. Diversity of *L. monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p.83-92, 2001.

WAGNER, M.; MADERNER, A.; BRANDL, E. Random amplification of polymorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* contamination in a cheese plant. **Journal of Food Protection**, v.59, n.4, p.384-389, 1996.

WALKER, W. H.; AYRES, J. C. Incidence and kinds of organisms associated with commercially dressed poultry. **Applied Microbiology**, v.4:345, 1956.

WALSH, D.; DUFFY, G.; SHERIDA, J. J.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A. Comparison of selective and non selective media for the isolation of *Listeria* species from retail foods. **Journal Food Safety**, v.18, p.85-89, 1998.

WALTMAN, D. **Monitoring and detection of Salmonella in poultry and poultry environments**. Workshop. Manual. Sponsored by the Georgia Poultry Laboratory and the National Poultry Improvement Plan. Oakwood, GA. 70-84, 90-170, 2000.

WERNARS, K.; BOERLIN, P.; AUDURIER, A.; RUSSEL, E. G.; CURTIS, G. D. W.; HERMAN, L.; VAN DER MEE-MARQUET, N. The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* sub typing: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, p.325-341, 1996.

WILLIAMS, J. G.; KUBELINK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18, p. 6531-6535, 1990.

YU, L. S. L.; PRASAI, R. K.; FUNG, D. Y. C. Most Probable numbers of *Listeria* species in raw meats detected by selective motility enrichment. **Journal of Food Protection**, v.58, p.943-945, 1995.

ZAHA, A. **Biologia molecular básica**. 3.ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2001. 336p.

ANEXOS

ANEXOS A - AUP: Autorização de Uso do Produto



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL/DIPOA
COORDENAÇÃO GERAL DE INSPEÇÃO

Ofício: **AUP/CGI/DIPOA N°3760/2005** Em, **28.12.2005.**

Da: Coordenação Geral de Inspeção - CGI /DIPOA
Endereço: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento / Secretária de Defesa Agropecuária / Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal / Anexo "A" - 4º andar - sala 426- Brasília/DF - CEP. 70.043-900

Assunto: **Autorização de Uso de Produto**

Comunicamos, para os devidos fins, que conforme a Instrução Normativa n° 08, de 16 de janeiro de 2002, publicado no DOU de 17/01/2002, Seção I, págs. 6-7, o DIPOA autoriza o uso do produto, abaixo relacionado, nos estabelecimentos sob Inspeção Federal, de acordo com o constante no Processo: 21000.009239/2005-38.

PRAZO DE VALIDADE: 28.12.2015

NOME DO PRODUTO: DESINFETANTE (Cloreto de alquil dimetil benzil amônia)

MARCA: **TIMSEN®**

FABRICANTE: United Promotions, Inc. – Atlanta – E.U.A

REPRESENTANTE: SANPHAR Química e Farmacêutica Ltda.

ENDEREÇO: Estrada Municipal Campinas/B. Campo Grande, s/nº, Km 8,5 – Caixa Postal 1082 – CEP:13.012-970 – Campinas/SP

FINALIDADE E MODO DE EMPREGO: Empregar como agente bactericida e fungicida nos processos de desinfecção de instalações, equipamentos e utensílios das indústrias alimentícias que manipulam produtos de origem animal sob inspeção federal.

Nota: A rotulagem do produto deverá atender ao disposto no item 2.4 da Instrução Normativa N° 08, de 16/01/2002.


Carlos Rogério Franco Figueiredo
Médico Veterinário – CRMV/MG 5407
Chefe de Divisão/DIPOA

ANEXO B - Relatório de ensaio laboratorial do produto TIMSEN frente *L. monocytogenes* utilizando concentração de 200ppm (partes por milhão)

UNIVATES CENTRO UNIVERSITÁRIO
Pró-Reitoria Administrativa
UNIANALISES – Laboratório de Prestação de Serviços da UNIVATES
LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS



RELATÓRIO DE ENSAIO

RELATÓRIO Nº: 24299/2009

Interessado: Valmor Lansini

Endereço: Santos Dumont, 317 - Pelotas - RS \ Brasil

Nº fiscal:

Data de recebimento: 20/10/2009

Hora do recebimento: 14:50

Data de amostragem: 19/10/2009

Hora da amostragem: 09:00

Material analisado: Sanitizante Timsen

Responsável pela colheita: não informado

Marca: não informado

Lote: não informado

Data de validade: novembro/2010

Data de fabricação/produção: novembro/2005

Período de realização do(s) ensaio(s): 25/10/2009 a 27/10/2009

Condição de realização do(s) ensaio(s): T: 20 - 25 °C UR: 50 ± 15 %

RESULTADOS:

Ensaio	Resultado	Unidade	Limite de tolerância	Metodologia
M 31 - Eficiência de Desinfetantes	Eficiente para o tempo de contato (20 minutos) à 4°C e 58°C A cepa em fase estacionária utilizada no teste foi: <i>Listeria monocytogenes</i> (4a) ATCC 19114	-	-	Portaria nº 101, agosto de 1993.

Limite de tolerância: É a tolerância máxima aceitável para amostra indicativa ou, quando for o caso, representativa conforme estabelecido pela legislação utilizada.

(*) Legislação: Não aplicável

Interpretação: Não aplicável

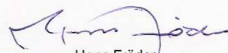
OBS: Peso da amostra: 200 gramas

Os resultados restringem-se à amostra entregue no Laboratório, e a reprodução parcial ou total deste relatório somente será possível com a autorização prévia do Laboratório responsável.

Para validação do relatório de ensaio é obrigatória a assinatura de somente um dos Gerentes Técnicos a seguir mencionados.

FIM

Lajeado, 05 de Novembro de 2009.


Hans Fröder
Gerente Técnico
CRBio 28448-03

Cláudia Majolo
Gerente Técnica Substituta
CRQ 05202101

Credenciamento no MAPA: Portaria Nº 120 – 08/11/07
Habilitação na ANVISA - ANALI 86
CRBio 3ª região 00330-01-03

Página 1 de 1

ANEXO C - Relatório de ensaio laboratorial de TIMSEN frente a um pool de Bactérias e de Fungos, utilizando diferentes concentrações do produto.



Rua Anhandeara, 14 - Chácara da Barra
Campinas - SP - CEP:- 13093 500
Fones (19) : 3252 1800 / 3252 1184
Fax: 3294 3255 - Celular: 9606 5305
www.avipa.com.br | avipa@avipa.com.br

RM | 17452
ENTRADA | 19/07/05
SAÍDA | 01/08/05

CLIENTE: SANPHAR QUÍMICA E FARMACÊUTICA LTDA.
DR. MARCELO ZIANI/DR. ANDRÉS ELOY
REQUISITANTE: S.CALDERÓN
MATERIAL: DESINFETANTE

TESTE de EFICIÊNCIA de DESINFETANTES

Nome Comercial	TIMSEN
----------------	--------

Pool de bactérias

Diluição/Tempo	20'
200ppm	Eficiente
400ppm	Eficiente
800ppm	Eficiente
Controle Positivo	Positivo
Controle Negativo	Negativo

Pool de fungos

Diluição/Tempo	20'
200ppm	Eficiente
400ppm	Eficiente
800ppm	Eficiente
Controle Positivo	Positivo
Controle Negativo	Negativo

Pool de Bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*,
Salmonella Typhimurium e *Proteus mirabilis*.

- Inóculo com 10⁶ a 10⁸ Unidades Formadoras de colônias/ ml.

Pool de Fungos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus sp.*
Inóculo com 10⁶ a 10⁸ esporos/ ml.

- Negativo= Ausência de crescimento de fungos ou bactérias (Eficiente).

Positivo= Crescimento de fungos ou bactérias (Não eficiente).

- Controle Negativo= Placas sem inoculação de pool de fungos ou pool de bactérias.

Controle Positivo= Placas inoculadas com o pool de fungos ou bactérias sem aplicação de desinfetante.

ANEXO D - Relatório de ensaio laboratorial com uso de TIMSEN em várias etapas do abate de aves utilizando concentrações de 50ppm (partes por milhão), frente Coliformes Totais e Coliformes Fecais.

TIMSEN na Indústria Avícola (Escaldagem – Pré-Chiller e Chiller)

TIMSEN está revolucionando o controle de patógenos em todos os pontos críticos de controle (PCC) na indústria. Ao contrário de qualquer outro produto no mercado, TIMSEN é comprovadamente efetivo no controle de vários organismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários, resistindo a condições extremas, inclusive de temperatura, nos Escaldadores, Pré-chiller e Chiller, equipamentos que nenhum outro desinfetante atua de modo eficaz.

O teste de eficácia do TIMSEN foi feito utilizando-se 3 carcaças, selecionadas ao acaso na linha de produção, identificadas através de uma fita azul e acompanhadas durante todo o processamento. A primeira carcaça foi separada em cortes e testada no primeiro PCC (Escaldador). A segunda foi testada no Pré-chiller e a terceira avaliada no Chiller.

TIMSEN foi aplicado em todos os PCCs da linha de processamento (Escaldador, Pré-chiller e Chiller) usando 50ppm do produto (0.125g de TIMSEN/litro de água). As amostras foram obtidas e enviadas para o Laboratório de Análises NULAB.

NOSSOS RESULTADOS TÉCNICOS

TESTE MICROBIOLÓGICO

Durante o processamento das carcaças, uma redução na carga microbiológica foi observada.

CONCLUSÕES

TIMSEN pode ser efetivamente utilizado para a limpeza e desinfecção de superfícies, ambientes, mãos dos operadores e matérias-primas.

•De acordo com os resultados obtidos, **TIMSEN** pode ser utilizado no Escaldador (200ppm), resultando num ótimo controle microbiológico no Pré-chiller e Chiller.

•**TIMSEN** reduz dramaticamente as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) em COLIFORMES TOTAIS e FECAIS durante o processamento. EM TODOS OS CASOS, os resultados obtidos estavam de acordo com a regulamentação técnica colombiana, para carcaças de frangos processadas.

*** O teste é disponível quando solicitado

Microorganismo	Redução (%)
Coliformes Totais	95,33
Coliformes Fecais	96,6