

**VIVIANA PATRÍCIA FRAGA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO DE CARÇAÇAS DE  
FRANGO DE CORTE APÓS ASPERSÃO DE ÁCIDO LÁTICO  
DURANTE O PROCESSO DE ABATE**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG,  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de  
Produtos de Origem Animal

Orientador: Tadeu Chaves de Figueiredo

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária da UFMG**  
**2018**

S237a Santos, Viviana Patricia Fraga dos. 1986-  
Avaliação do perfil microbiológico de carcaças de frango de corte após aspersão de ácido láctico durante o processo de abate / Viviana Patricia Fraga dos Santos. – 2018. 86 p. : il.

Orientador: Tadeu Chaves de Figueiredo  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

1. Frango de corte – Carcaças – Análise – Teses. 2. Frango de corte – Carcaças – Qualidade – Teses. 3. Ácido láctico – Teses. 4. Microbiologia veterinária – Teses.  
I. Figueiredo, Tadeu Chaves de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508

## FOLHA DE APROVAÇÃO

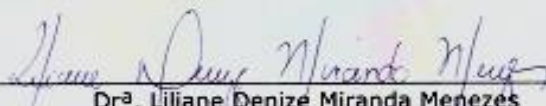
### VIVIANA PATRÍCIA FRAGA DOS SANTOS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

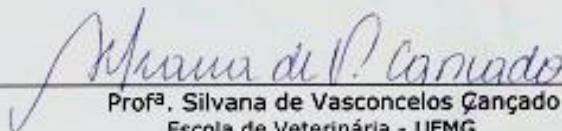
Aprovada em 22 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Tadeu Chaves de Figueiredo  
Presidente - Orientador



Drª. Lilliane Denize Miranda Menezes  
Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA



Profª. Silvana de Vasconcelos Zançado  
Escola de Veterinária - UFMG



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por que dEle, por Ele e para Ele é todo este trabalho.

Ao Professor Tadeu, pela paciência, por tanta confiança e pela total dedicação a este projeto.

À equipe do Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos do Instituto Mineiro de Agropecuária, pela oportunidade e infraestrutura para realização das análises e por todo suporte técnico na preparação dos meios. Agradeço, especialmente, à Doutora Liliane pela acolhida, por todo carinho, paciência, suporte e ensinamentos.

À Professora Silvana que, mesmo à distância, deu todo auxílio necessário.

Ao Victor Pastore, pelo companheirismo, dedicação e empenho na execução deste trabalho. Agradeço, também, ao Guilherme Resende.

Aos meus líderes de célula, Janderson e Luciana, pelo amor, paciência, orações e carinho.

Aos meus irmãos, á Josiane, à Dona Liliam e aos meus amigos, por me darem o suporte necessário para que eu concluísse essa jornada.

Ao Aquacen, Laboratório Oficial Central do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), localizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG), pela realização das análises proteômicas. Em especial, agradeço ao Prof. Henrique e à Médica Veterinária Gabriela Borba pela disponibilidade.

Ao colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal – DTIPOA.

Ao CNPq que forneceu todos os recursos necessários para o desenvolvimento deste trabalho e, também, a bolsa de pós-graduação.



---

## SUMÁRIO

---

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. AVICULTURA NO BRASIL	16
3.2. MICRO-ORGANISMOS NA CARNE DE FRANGO	18
3.2.3. COLIFORMES	23
3.2.4. <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP.	26
3.2.5. <i>SALMONELLA</i> SPP.	28
3.2.6. MICRO-ORGANISMOS PSICROTRÓFICOS	30
3.2.7. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	33
3.3. DESCONTAMINANTES UTILIZADOS EM CARCAÇAS DE FRANGO	35
3.3.1. ÁCIDO LÁTICO (AL)	37
3.4. ANÁLISE PROTEÔMICA	44
3.4.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR DESSORÇÃO E IONIZAÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ – TEMPO DE VOO (EM MALDI – TOF) NA IDENTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS	48
4.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES DESCONTAMINANTES	49
4.3. TRATAMENTOS	49
4.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	49
4.4.1. COLIFORMES A 35°C E 45°C	50
4.4.2. <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP.	51
4.4.3. <i>SALMONELLA</i> SPP.	51
4.4.4. MICRO-ORGANISMOS PSICROTRÓFICOS	51
4.4.5. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	51
4.5. IDENTIFICAÇÃO PROTEÔMICA	52
4.6. DELINEAMENTO	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	52
5.1.1. CONTAGENS DE COLIFORMES, <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. E MICRO-ORGANISMOS PSICROTRÓFICOS	52
5.1.2. PESQUISA DE <i>LISTERIA</i> SPP. E <i>SALMONELLA</i> SPP.	56
5.2.1. <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP.	58
5.2.2. MICRO-ORGANISMOS PSICROTRÓFICOS	62
5.2.3. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	65
5.2.4. <i>SALMONELLA</i> SPP.	67
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

---

## LISTAS DE ABREVIATURAS

---

°C	Graus Célsius
AL	Ácido Láctico
AOEA	Água Oxidante Eletrolisada Ácida
A/E	Attaching and effacing Agar
BP	Agar Baird Parker
AOELA	Água Oxidante Eletrolisada Ligeiramente Ácida
BAL	Bactérias Ácido Lácticas
CVT	Contagem de Viáveis 35°C
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difuso aderente
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EM MALDI-TOF	Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo de Voo
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Departamento de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
G	Gramas
GRAS	Geralmente Considerado Seguro
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
LSMA	Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos
LT	Toxina Termolábil
MALDI	Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MPA	Ministério de Pesca e Aquicultura
NMP	Número mais provável
PCR	Reação da cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliácridamida - análise de padrão de proteína de célula inteira
SE	Enterotoxina estafilocócica
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
sp.	Espécie
spp.	Subespécies
ST	Toxina termoestável
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtoras de toxina <i>Shiga</i>
TOF	Tempo de Voo
EU	União Europeia
UFC	Unidade formadora de colônia
VTEC	<i>Escherichia coli</i> Verotoxigênica



---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b>	Média das contagens de coliformes 35°C e 45°C, <i>Staphylococcus</i> spp. e psicrotróficos (UFC g <sup>-1</sup> ) em carcaças de frango após aspersão de água (controle) e ácido láctico a 5% e 7%	..... 53
<b>Tabela 2</b>	Número de amostras positivas, em porcentagem, para <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp. em carcaças de frango após aspersão de água (controle) e ácido láctico a 5% e 7%	..... 57

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b>	Esquema representando o fluxograma do abate de aves e as possíveis rotas de contaminação associadas	.....19
<b>Figura 2</b>	Fórmula estrutural do D- ( - ) Ácido láctico (A), DL – Ácido láctico (B) e L- (+) Ácido láctico (C)	.....38
<b>Figura 3</b>	Mecanismo de ação de ácidos orgânicos em células microbianas	.....39
<b>Figura 4</b>	Representação esquemática de ionização por fonte de MALDI	.....46
<b>Figura 5</b>	Representação esquemática do Reflectron – analisador tipo TOF com sistema refletor	.....46
<b>Figura 6</b>	Locais de coleta de amostras de pele e músculo das carcaças de frango	.....50

---

## LISTA DE GRÁFICOS

---

<b>Gráfico 1</b>	Produção de Carne de Frango (milhões de toneladas) entre os anos 2006-2017, Brasil	.....17
<b>Gráfico 2</b>	Porcentagem de produção (A) e exportação (B) de carne de frango por estado brasileiro em 2017	.....17
<b>Gráfico 3</b>	Relação de espécies identificadas em carcaças de frango após aspersão de água e ácido láctico a 5% e 7% e cultivadas em Ágar Baird-Parker (BP)	.....59
<b>Gráfico 4</b>	Relação dos gêneros bacterianos identificados em carcaças de frango após aspersão de água, ácido láctico 5% e 7% e cultivados em Ágar BP	.....60
<b>Gráfico 5</b>	Relação das espécies identificadas em carcaças de frango após aspersão de água, ácido láctico 5% e 7%, cultivados em Ágar Padrão para Contagem e incubados durante dez dias a $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$	.....63
<b>Gráfico 6</b>	Relação dos gêneros bacterianos identificados em carcaças de frango após aspersão de água, ácido láctico 5% e 7%, cultivados em Ágar Padrão para Contagem e incubados durante dez dias a $7 \pm 1^{\circ}\text{C}$	.....64
<b>Gráfico 7</b>	Relação das espécies identificadas em carcaças de frango após aspersão de água, ácido láctico a 5% e 7% e cultivados em Ágar Palcam	.....66
<b>Gráfico 8</b>	Relação das bacterianos identificados em carcaças de frango após aspersão de água e ácido láctico 5% e 7% e cultivados em Ágar Rambach	.....68
<b>Gráfico 9</b>	Relação de gêneros bacterianos identificados em carcaças de frango após aspersão de água e ácido láctico 5% e 7% e cultivados em Ágar Rambach	.....69

---

## LISTA DE QUADROS

---

<b>Quadro 1</b>	Descontaminantes químicos e físicos utilizados em carcaças de animais de açougue	.....35
-----------------	----------------------------------------------------------------------------------	---------

## RESUMO

Com o objetivo de caracterizar microbiologicamente carcaças de frango de corte após a aspersão de ácido láctico a 5% e 7% e avaliar o seu efeito na redução da carga microbiológica autóctone, patogênica e deteriorante, foram analisadas 90 carcaças de frango, coletadas logo após o processo de abate e armazenadas sob refrigeração por sete dias. Foram isoladas também 1016 colônias bacterianas para caracterização da microbiota presente nas carcaças por identificação proteômica pela técnica de Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz: Tempo de Voo (MALDI -TOF). Não foram observadas reduções nas contagens de coliformes 35°C e 45°C, *Staphylococcus* spp. e micro-organismos psicrotróficos em nenhum dos tratamentos avaliados. Do total de carcaças analisadas, 45,6% foram positivas para coliformes 45°C e apenas uma carcaça foi positiva para *Staphylococcus aureus*. Da mesma forma, não foram observadas reduções na incidência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em nenhum dos tratamentos, sendo encontrado uma frequência de, respectivamente, 15,5% e 18,9% para estes patógenos. A caracterização microbiológica demonstrou a presença de 29 gêneros bacterianos, incluindo espécies patogênicas como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* e *Shewanella putrefaciens*. Foi concluído que a aspersão de ácido láctico não resultou na melhoria da qualidade microbiológica das carcaças de frango e a presença de micro-organismos patogênicos pode representar risco a saúde dos consumidores.

**Palavras-chave:** ácido láctico, aspersão, carcaça de frango, MALDI-TOF, microbiologia, qualidade.

## ABSTRACT

In order to characterize microbiologically broiler carcasses after lactic acid spraying (5% and 7%) and to evaluate your effect on the reduction of the pathogenic and deteriorating microbiological load, 90 chicken carcasses were collected after the slaughter process and stored under refrigeration for seven days. 1016 bacterial colonies were also isolated to characterize the microorganisms present in the carcasses by proteomic identification by the Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). No reductions were observed in total and thermotolerant coliforms counts, *Staphylococcus* spp. and psychrotrophic microorganisms in none of the evaluated treatments. Of the total carcasses analyzed, 45.6% were positive for thermotolerant coliforms and only one carcass was positive for *Staphylococcus aureus*. Likewise, no reductions were observed in the incidence of *Listeria monocytogenes* and *Salmo nella* spp. in none of the treatments, being a frequency of, respectively, 15.5% and 18.9% for these pathogens. Microbiological characterization showed the presence of 29 bacterial genera, including pathogenic species such as *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *Shewanella putrefaciens*. It was concluded that the spraying of lactic acid did not improve the microbiological quality of chicken carcasses and the presence of pathogenic microorganisms may represent a risk to the health of consumers.

**Key words:** lactic acid, spraying, chicken carcasses, MALDI-TOF, microbiology, quality.

## 1. INTRODUÇÃO

Durante a última década foi observado um crescimento sem precedentes na demanda por carne de aves, sendo o frango uma das carnes mais consumidas e comercializadas no mundo, com uma produção anual superior a 120 milhões de toneladas (Wang *et al.*, 2017; FAO, 2018). Essa popularidade pode ser explicada, principalmente, pelo fato da carne de frango ser uma fonte proteica de fácil preparo, mais barata, saudável e nutritiva, em comparação à carne de outros animais, e por não haver restrições religiosas quanto ao seu consumo (Mulder, 1999; Mead, 2000).

Em resposta a essa crescente demanda, a avicultura brasileira vem apresentando números históricos, alcançando recordes de produção, mantendo o país no posto de maior exportador e segundo maior produtor mundial do setor. Em 2017 foram produzidas mais de 13 milhões de toneladas de carne de frango, sendo que, do volume total produzido, aproximadamente 67,0% foi destinado ao mercado interno e 33,0% à exportação (ABPA, 2018). Para a próxima década, as projeções para o Brasil apontam um intenso crescimento do setor, com um crescimento de 29% na produção (Brasil, 2018a; FAO, 2017).

Neste contexto de aumento da produção e consumo, garantir a qualidade sanitária e organoléptica da carne de frango tem se tornado uma questão imperativa, com vistas a ofertar ao consumidor um produto microbiologicamente seguro, com maior tempo de vida útil e que apresente características sensoriais como cor, odor e sabor adequadas (Bolder, 1997; Alonso-Hernando *et al.*, 2012). Todavia, apesar da aplicação rigorosa de boas práticas agrícolas e dos programas de higiene e de autocontrole durante o abate e processamento, a contaminação da carcaça com agentes patogênicos e deteriorantes oriundos da microbiota animal, do ambiente e dos equipamentos, não pode ser completamente evitada (Bolder, 1997; Mead, 2004; Loretz *et al.*, 2010; Buncic e Sofos, 2012). Além disso, devido a características intrínsecas como elevada atividade de água, composição química e pH próximo da neutralidade, associado aos fatores do processo de obtenção que favorecem a uma contaminação cruzada durante as etapas de depena, evisceração e pré-resfriamento, a carne de frango torna-se um oportuno veículo e substrato para o crescimento de micro-organismos, muitas vezes patogênicos, estando frequentemente envolvida em surtos alimentares (ICMSF, 2005; Hayama *et al.*, 2011; Buncic e Sofos, 2012; Liu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Entre os anos de 1998-2008 a carne e derivados de aves foram relacionados a aproximadamente 10% das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) nos EUA sendo gastos, aproximadamente, US\$ 2,4 bilhões devido a estas doenças (Batz *et al.*, 2012; Painter *et al.*, 2013). Em 2015, esses produtos foram responsáveis por 9,0% dos surtos de DTAs na União Europeia (EFSA, 2016). No Brasil, ainda que com dados subestimados, a carne de aves *in natura*, processados e miúdos foram responsáveis por, aproximadamente, 2% dos surtos de DTAs entre os anos de 2000 e 2017, sendo *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* os agentes etiológicos mais identificados nesses surtos (Brasil, 2018b).

Uma variedade de soluções descontaminantes para serem utilizadas em carcaças de frango durante o processo de abate já foram propostas como, por exemplo, o cloro, ácidos orgânicos, fosfatos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ozônio, irradiação e energia ultra-violeta (Bolder, 1997) sendo amplamente empregadas pelas indústrias de carnes da América do Norte (FSIS, 2016; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2017). Dentre estas substâncias, a eficácia de substâncias naturais, como os ácidos orgânicos fracos, tem despertado o interesse dos pesquisadores, em especial devido à percepção negativa por parte dos consumidores em relação à utilização de conservantes químicos em produtos alimentícios (Mead, 2004; Okolocha e Ellerbroek, 2005;

Mani-López *et al.*, 2012; Bearth *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016). Nesse sentido, o Ácido Lático (AL) é, inicialmente, a escolha mais apropriada para ser utilizado como descontaminante pela indústria frigorífica, por ser este um composto natural, produzido durante a glicólise pós-morte na carne e em alimentos cárneos fermentados, ser reconhecido como uma substância segura para produtos alimentares, ser barato e não possuir odor ou sabor desagradável quando diluído (Bolder, 1997; Gonçalves *et al.*, 2005; Lecompte *et al.*, 2008; Mani-López *et al.*, 2012; FSIS, 2016).

Devido a grande diversidade de espécies bacterianas que podem estar hospedadas na pele dos frangos de corte, uma análise abrangente da microbiota presente em suas carcaças possibilitaria um melhor entendimento das interações, bem como da biodiversidade dessa microbiota. Tais conhecimentos podem ser de extrema relevância para a implementação de estratégias que possibilitem uma melhor qualidade sanitária da carne de aves.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi caracterizar microbiologicamente carcaças de frango de corte coletadas logo após o processo de abate em um frigorífico sob inspeção oficial, aspergidas com ácido lático a 5% e 7% e armazenadas sob refrigeração por sete dias empregando-se a técnica de Espectrometria de Massas por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz: Tempo de Voo (EM MALDI – TOF). Objetivou-se também, avaliar o efeito do ácido lático na redução da carga microbiológica autóctone, patogênica e deteriorante, dessas carcaças.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

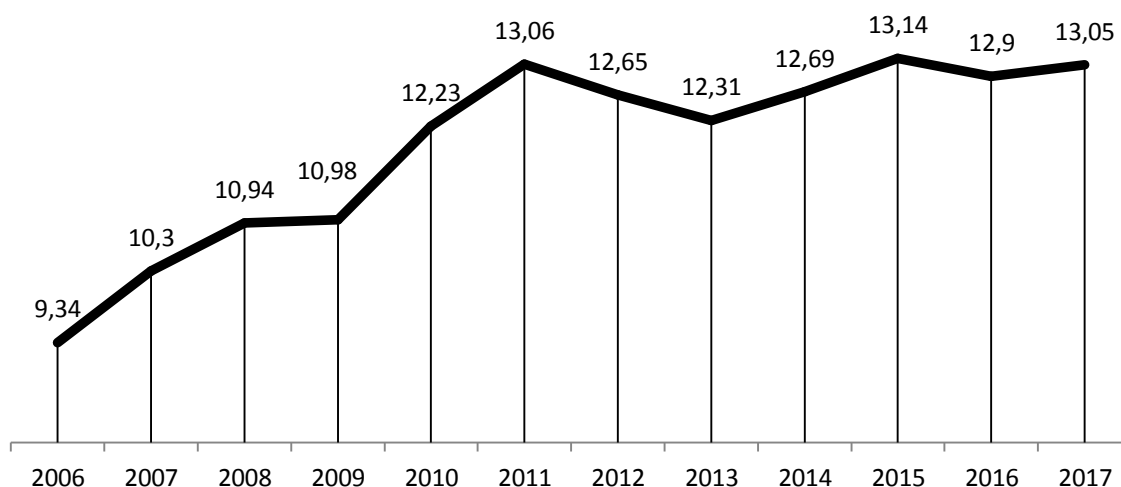
### **3.1. Avicultura no Brasil**

Desde a chegada dos primeiros exemplares de frangos em solo brasileiro, em 1500, até os dias atuais, a produção desta ave no Brasil passou por intensas transformações. Devido à simplicidade na sua criação, em comparação a outros animais como bovinos e suínos, a avicultura desenvolveu-se rapidamente, inicialmente de forma artesanal nas cidades litorâneas e, com o aumento da demanda por alimentos, desencadeado pelo crescimento populacional e econômico no país, passou a ser realizada com fins comerciais, sendo o estado de Minas Gerais o maior produtor e o principal abastecedor de carne de frango naquele período (UBABEF, 2011).

A expansão da avicultura brasileira continua nos últimos anos (Gráfico 1) apesar da desestabilização econômica vivenciada pelo país. Em 2015 foram produzidas mais de 13,1 milhões de toneladas de carne de frango, elevando o país ao posto de segundo maior produtor mundial, posição antes ocupada pela China. Desde esta data a indústria avícola nacional tem sustentado esta posição, empregando, direta ou indiretamente, mais de 3,6 milhões de pessoas e representando aproximadamente, 1,5% do Produto Interno Bruto brasileiro (ABPA, 2017).



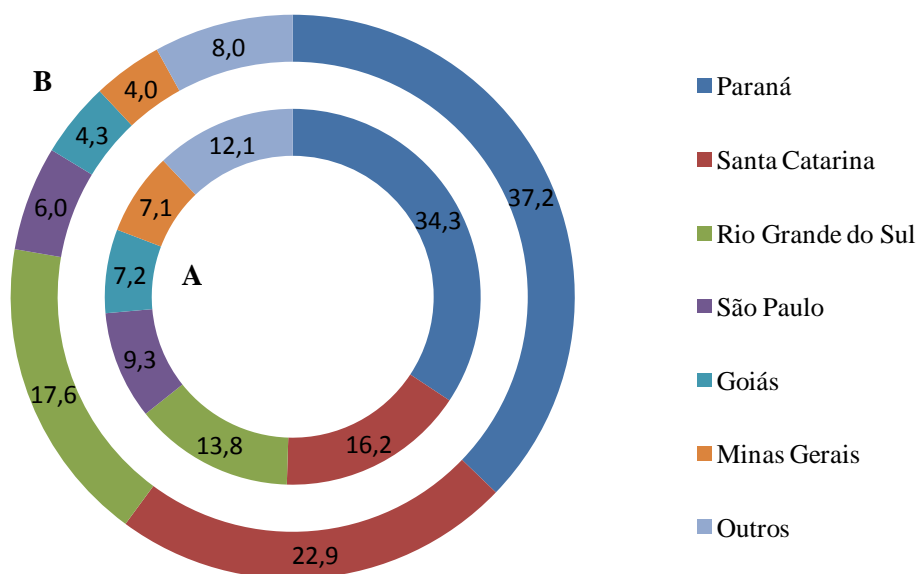
**Gráfico 1:** Produção de carne de frango (milhões de toneladas) entre os anos 2006-2017, Brasil.



Fonte: ABPA (2018)

Em relação à distribuição geográfica da produção de carne de frango no Brasil, ainda que presente em todo o território, mostra-se mais concentrada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, sendo a região Sul a mais expressiva, responsável por, aproximadamente, 64,3% do abate e 77,7% da exportação nacional (Gráfico 2). Entre os estados, Minas Gerais, que ocupava o posto de quinto produtor e exportador nacional (ABPA, 2017), passou a ocupar a sexta posição, sendo responsável por 7,1% e 4,0% da produção e exportação brasileira, respectivamente (ABPA, 2018).

**Gráfico 2:** Porcentagem de produção (A) e exportação (B) de carne de frango por estado brasileiro em 2017



Fonte: ABPA, 2018.

## **3.2. Micro-organismos na carne de frango**

Os micro-organismos associados aos alimentos podem ser, de forma geral, classificados como pertencentes a três grandes grupos. O primeiro grupo é considerado benéfico e importante para o processamento de alimentos, como carnes fermentadas e laticínios. O segundo grupo contém os micro-organismos que, ao infectar plantas e animais, acarretam doenças e redução dos suprimentos de alimentos disponíveis para os seres humanos. No entanto, esses micro-organismos não são associados a doenças transmitidas a partir do fornecimento de alimentos. Por fim, o terceiro grupo de micro-organismos contém aqueles que, ao se ligarem a superfície dos alimentos, podem ser transportados ou transmitidos aos seres humanos, causando as doenças transmitidas por alimentos, podendo ou não estar associados aos processos de deterioração dos produtos, acarretando em grandes perdas econômicas (Benedict, 1988).

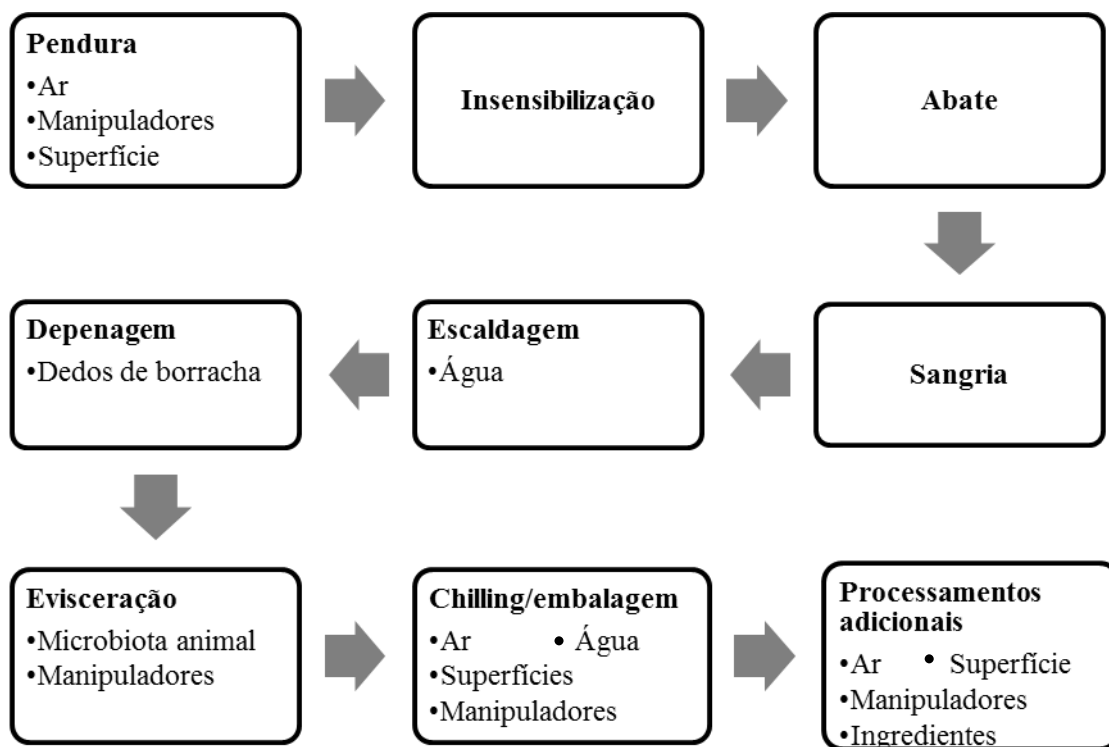
Sendo assim, ainda que em um animal saudável não seja esperado qualquer tipo de contaminação nas camadas musculares profundas, mesmo saudáveis, os animais carregam um grande número de bactérias nas penas, pele e nos tratos gastrintestinal e respiratório, o que pode acarretar em contaminação da carne por micro-organismos deteriorantes e patogênicos durante o processamento tecnológico de obtenção das carcaças (Guerreiro e Taylor, 1994).

### **3.2.1. Fontes de contaminação das carcaças em abatedouros**

As normas e procedimentos dentro do sistema de abate de frangos de corte são, basicamente, os mesmos em todo o mundo. A Figura 1 resume o fluxograma de obtenção da carne de aves, considerando as principais etapas adotadas pela indústria frigorífica e as possíveis rotas de contaminações associadas. Após chegarem ao abatedouro frigorífico, as aves são penduradas pelos pés em nórias que as transportam até o tanque de atordoamento elétrico por imersão sendo, em sequência, realizado, de forma manual ou mecânica, o seccionamento dos vasos sanguíneos cervicais (artérias e veias), etapa denominada sangria. Contínuo ao túnel de sangria, as aves são imersas em água aquecida – Etapa de escaldagem – com o intuito de promover o afrouxamento do folículo piloso e facilitar o processo de retirada das penas – Etapa de depenagem – realizado com o auxílio de máquinas dotadas de “dedos” de borracha flexível. Continuamente, os próximos estágios são a remoção da cabeça, pés e vísceras, etapas realizadas de forma manual ou por máquinas automáticas. A última etapa do processo tecnológico de obtenção da carne de frango consiste no sistema de pré-resfriamento que, no Brasil, é realizado, majoritariamente, em tanques de água fria com gelo, denominados pré-chiller e chiller, no qual as carcaças de frango permanecem imersas por até 30 minutos. Após o pré-resfriamento, as aves passam por um período de gotejamento para remoção do excesso de líquido absorvido, sendo direcionadas, em seguida, à sala de embalagem ou cortes (Brasil, 1998; Mead, 2000).

Dentre as etapas citadas, a pendura, depenagem, escalda, evisceração, tanque de resfriamento e os processamentos adicionais são os principais pontos de contaminação das carcaças. A carga bacteriana pode ser proveniente dos equipamentos, da água, da microbiota animal, do ar e dos manipuladores. Além disso, o contato direto da pele das carcaças com as superfícies facilita a contaminação cruzada entre as carcaças e, também, a contaminação do ambiente a partir de carcaças contaminadas (Rouger *et al.*, 2017). Portanto, o manejo inadequado em uma das etapas do processo de abate poderá acarretar em um impacto negativo sobre as etapas seguintes e, conseqüentemente, sobre o produto final. Dessa forma, a qualidade sanitária e a vida útil da carne e seus derivados encontram-se diretamente relacionados ao estado microbiológico dos

animais abatidos e da carcaça obtida ao final do processamento tecnológico, ou seja, quanto maior a contagem microbiana inicial nas carcaças, mais rápido será o processo deteriorativo e maior o risco sanitário desse produto. Contagens bacterianas próximas a  $10^6/\text{cm}^2$  podem ser suficiente para o aparecimento de odores desagradáveis em carnes frescas e, se superiores a  $10^8/\text{cm}^2$ , podem acarretar em descoloração e presença de limo (FAO, 1991).



**Figura 1:** Esquema representando o fluxograma do abate de aves e as possíveis rotas de contaminação associadas.

Adaptado de Rouger *et al.* (2017).

Uma diversidade de micro-organismos podem colonizar as carcaças de frangos. Geralmente, em aves recém-abatidas são, primariamente, observadas bactérias mesófilas. Em contraste, após o resfriamento das carcaças a população bacteriana passa a ser composta, em sua maioria, por micro-organismos psicrotróficos (Russell *et al.*, 1996). Fatores como temperatura, condições de armazenamento, diferenças na capacidade de colonização, limitação de dispersão ou competição podem definir a diversidade microbiana encontrada e, também, as alterações observadas na carne deteriorada (Oakley *et al.*, 2013).

Ao observar a pele de trinta carcaças de frango, coletadas e analisadas imediatamente após o processo de pré-resfriamento por imersão, Barnes e Thornley (1966) observaram, a partir de características morfológicas e bioquímicas das colônias isoladas, uma predominância de bactérias do gênero *Micrococcus* (50%), bastonetes Gram-positivos (14%), flavobactérias (14%), enterobactérias (8%) e apenas 2% de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Entretanto, após o armazenamento das carcaças por 10 a 11 dias a  $1^\circ\text{C}$ , os pesquisadores observaram uma grande mudança na microbiota, sendo *Pseudomonas* spp. o gênero predominante (90%), seguido de *Acinetobacter* (7%) e *Enterobacteriaceae* (3%).

Thomas e McMeekin (1980) observaram, a partir do exame da pele do peito e da coxa de frangos de corte, que as etapas de escalda e depena, ao expor a derme das carcaças, facilitam a contaminação por micro-organismos presentes nas depenadeiras e etapas posteriores. Os pesquisadores observaram que a pele das carcaças submetidas apenas à etapa da sangria apresentava, quase que exclusivamente, bactérias do gênero *Micrococcus*, presente em material particulado na superfície da pele. Após as etapas de escalda, depena e imersão no sistema de pré-resfriamento, no entanto, foi observada a presença de diversos tipos bacterianos, sendo os gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella* e *Acinetobacter* os mais abundantes. Ao relacionar a contaminação das peles à água utilizada em cada etapa do processamento, Thomas e McMeekin verificaram que, tanto a água do tanque de escalda, quanto à água utilizada para lavar as carcaças e abastecer o tanque de pré-resfriamento, havia contribuído irrisoriamente com a contagem de psicotróficos. As principais fontes de contaminação foram a água presente no tanque de pré-resfriamento e o gelo utilizado para resfriamento dessa água. Concluindo, como a água utilizada no sistema de abastecimento estava virtualmente livre desses micro-organismos, para os autores, as superfícies das máquinas devem ser a principal fonte de contaminação.

Russell *et al.* (1996) investigaram as bactérias responsáveis pela deterioração de carcaças de frangos de corte em diferentes estados dos Estados Unidos da América (EUA). Foram analisadas amostras oriundas de plantas de processamento ou do varejo provenientes do nordeste da Geórgia (10 carcaças), do sudeste dos EUA (12 carcaças), do Arkansas (quatro carcaças), da Califórnia (quatro carcaças) e da Carolina do Norte (três carcaças) num total de 33 carcaças. As amostras foram conservadas por 15 dias a  $3^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  nas embalagens de origem ou em sacos de polietileno estéreis. Após este período, amostras da microbiota presente em cada carcaça foram coletadas pelo método de enxague e incubadas em ágar PCA para posterior identificação por métodos rápidos de identificação bioquímica. Dentre as espécies isoladas, as mais frequentes foram *Pseudomonas fluorescens*, nas amostras provenientes da Carolina do Norte, e *Shewanella putrefaciens*, nas amostras da Geórgia, Arkansas e Califórnia. Os pesquisadores identificaram, ainda, diversas cepas do gênero *Pseudomonas*, como *P. putida*, *P. fragi*, além de *Aeromonas veronii*, *Acinetobacter lwoffii*, *Alteromonas haloplanktis*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*, *Serratia liquefaciens* e *S. fonticola*.

Do mesmo modo, Hinton Jr. *et al.* (2004) examinaram o efeito das etapas do processamento tecnológico de obtenção de carcaças de frango e do armazenamento refrigerado na microbiota psicotrófica em 144 carcaças de frango de corte coletadas em uma instalação de processamento comercial. Os pesquisadores observaram que a água do tanque de escalda e os dedos de borracha da depenadeira mecânica foram as principais fontes de contaminação cruzada na instalação e que houve um aumento generalizado no número de bactérias deterioradoras nas carcaças durante o período de armazenamento, com contagens entre  $1,2 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> nas carcaças armazenadas por sete dias e de  $2,1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> a  $1,6 \times 10^{12}$  UFC mL<sup>-1</sup> após 14 dias de armazenamento a 4°C. Após identificação por cromatografia gasosa, *Pseudomonas* spp. foi o gênero bacteriano predominante em carcaças refrigeradas por mais de sete dias, *Brochothrix thermosphacta* foi isolado apenas em carcaças armazenadas por sete dias, enquanto *Shewanella putrefaciens* foi isolado em carcaças refrigeradas por sete, dez e 14 dias. Outras espécies encontradas foram *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida-masoucida*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas sobria*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*.

Com o intuito de entender a dinâmica bacteriana em frangos de cortes da fazenda até o mercado consumidor americano, Oakley *et al.* (2013) analisaram, a partir do sequenciamento de alto rendimento (HTS), amostras de fezes, cama de frango seca e úmida, provenientes de duas granjas comerciais no sudeste dos EUA, e 25 carcaças oriundas desses mesmos lotes, coletadas após a etapa de pré-resfriamento por imersão em água clorada. Amostras das carcaças de frango foram analisadas no tempo zero, por lavagem superficial, e 48h após armazenamento a 4°C, a partir do exsudato presente na embalagem utilizada para seu armazenamento. Nas amostras fecais, os micro-organismos mais abundantes foram *Fusobacterium* Gram-negativo, espécies dos gêneros *Actinomicetos*, *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. e *Fusobacterium* spp. As amostras da cama de frango apresentaram contaminações semelhantes às observadas nas fezes, diferenciando apenas em relação a grande presença de *Staphylococcus* spp. e sequências mais intimamente relacionadas à *Shigella* spp. Entretanto, contrário à expectativa dos autores, de que houvesse uma semelhança ente os micro-organismos fecais e das camas de frango com aqueles presentes nas carcaças, os resultados mostraram uma grande divergência entre a microbiota. As principais espécies observadas nas carcaças, no tempo zero ou 48h após abate, foram pertencentes aos gêneros *Gallibacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Além disso, foi observado uma diversidade taxonômica entre as amostras oriundas das carcaças nos dois tempos avaliados, sendo mais de dois terços das amostras distintas. Uma hipótese proposta pelos autores é a de que as bactérias identificadas após o armazenamento sob refrigeração são aquelas que sobreviveram ao cloro presente no tanque de resfriamento e foram capazes de multiplicar. Os autores também coletaram amostras de cortes de frango (coxas, sobrecoxas e peito) oriundas do varejo para identificar espécies bacterianas com atividade metabólica, definidas pela presença de moléculas de rRNA intactas, a partir de técnicas de PCR. Ao analisarem o exsudato presente nas embalagens dos produtos, os pesquisadores observaram uma predominância de bactérias do gênero *Pseudomonas*, representando 98% das sequências identificadas. Dentre as espécies observadas, *P. fragi*, *P. meridiana*, *P. psychrophila* e *P. antarctica* foram as mais prevalentes.

### 3.2.2. Estrutura da pele e os mecanismos de adesão bacteriana

A pele de frangos de corte pode ser dividida, resumidamente, em camadas epidérmicas e dérmicas, estas separadas por uma membrana basal. A epiderme é composta, basicamente, por um tecido estratificado pavimentoso queratinizado, sendo formada por várias camadas justapostas. Dentre estas camadas, a camada córnea (estrato córneo) é a mais superficial, constituída por células achatadas, mortas, unidas principalmente nas bordas, formando lâminas finas, e contendo, geralmente, apenas queratina e material lipídico (Junqueira e Carneiro, 2004).

As bactérias podem ser encontradas firmemente ligadas à pele das aves desde o momento em que os animais chegam à planta de abate, não sendo totalmente removidas durante o processamento tecnológico. Além disso, devido às características fisiológicas e estruturais da pele, como alto teor de gordura, presença de dobras, folículos e fissuras, que abrigam e protegem os micro-organismos dos tratamentos descontaminantes, e, também, ao fato desse órgão estar em contato permanente com possíveis fontes de contaminação como o ambiente industrial, equipamentos, utensílios, água e trabalhadores, a pele torna-se um dos principais locais de contaminação das carcaças de frango e o mais difícil de ser controlado (ICMFS, 2005; Lecompte *et al.*, 2009).

A microscopia eletrônica de transmissão e a microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas por Thomas e McMeekin (1980) para visualização da microestrutura da pele de carcaças de frangos. Os autores compararam a estrutura da epiderme ao longo do processo

tecnológico de abate e observaram que as etapas de escalda e depena resultam na remoção da camada epidérmica da pele e do tecido dérmico subjacente, restando, no entanto, pequenos fragmentos de células epidérmicas aderidos à lâmina basal intacta. Antes dessas etapas a superfície da pele das carcaças apresentava-se áspera e com dobras, sendo coberta com células finas, achatadas e com aglomerados densos de material particulado como poeira e outros detritos. Após a etapa de depena a superfície dérmica apresentou-se relativamente lisa, mas profundamente canalizada, formando canais e pregas na superfície epidérmica ou espaços intercelulares dérmicos. Além disso, depois de submetidas ao pré-resfriamento por imersão, a superfície da pele das carcaças mostrou-se aparentemente inchada e coberta por um filme líquido repleto de componentes orgânicos como proteínas séricas, aminoácidos entre outros compostos. Esse inchaço, aparentemente em decorrência da absorção de água pelo tecido da pele, abre e expõe os canais e fissuras, formados durante a etapa de depenagem, a contaminantes presentes na água utilizada durante as etapas de processamento. Para os autores, a presença dessa matéria orgânica no filme que recobre a pele das carcaças, associado ao inchaço que pode aprisionar bactérias nos canais e fendas presentes na pele, podem ser uma barreira à ação de substâncias antibacterianas utilizadas durante o processamento e à remoção física destes micro-organismos.

Semelhantemente, Kim *et al.* (1996) observaram com o auxílio de um microscópio confocal de varredura a laser, a estrutura microscópica de peles do peito de frangos, inoculadas com suspensões de *Salmonella* Typhimurium ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) por duas horas e, posteriormente, lavadas, com o auxílio de uma pipeta elétrica com pressão constante, para a remoção das bactérias fracamente ligadas. Ainda que a maioria das células bacterianas tenha sido removida da superfície do tecido epitelial após o enxague, os pesquisadores puderam visualizar células aprisionadas nos folículos das penas e em fendas da pele, confirmando que esses locais podem atuar como fonte significativa de contaminação durante os processos de resfriamento por imersão das aves. Também Jang *et al.* (2007), após inocularem pele de frango com cepas de *Campylobacter jejuni* nas formas espiral e cocoide, visualizaram bactérias flutuando livremente no líquido circundante no interior das fendas e folículos das penas, mesmo após a pele ter sido lavada.

O processo de fixação bacteriana e a capacidade desses agregados de células resistirem aos processos de limpeza e desinfecção não estão completamente elucidados devido a sua complexidade (Firstenberg-Eden, 1981). A adesão ou adsorção bacteriana é o primeiro passo na contaminação, sendo descrito por Marshall *et al.* (1971) como um procedimento realizado em duas etapas: ligação reversível e ligação irreversível. Na primeira etapa as bactérias encontram-se presas em um filme de água na superfície de contato, podendo ser facilmente removidas. Posteriormente, as células bacterianas ancoradas produzem uma matriz complexa propícia ao crescimento e fixação de mais bactérias, resultando na formação de uma ligação mais permanente entre esses micro-organismos e a superfície colonizada, etapa denominada como fixação irreversível. O processo pelo qual as bactérias aderem às superfícies e formam essa comunidade bacteriana, denominada como biofilme, pode ser influenciado positivamente ou negativamente por diversos fatores como, por exemplo, a natureza da superfície de fixação, a carga das superfícies celulares, hidrofobicidade, estruturas bacterianas (flagelos, fimbria, pili e polissacarídeos extracelulares), pH, temperatura, entre outros fatores (Fletcher e Floodgate, 1973; Firstenberg-Eden, 1981; van Loosdrecht *et al.*, 1987).

Notermans e Kampelmacher (1974) observaram, ao submeterem carcaças de frango a soluções contaminadas com cepas de *E. coli* flagelada, *E. coli*, não flagelada, *Lactobacillus brevis* e

*Klebsiella* sp. não móveis e três cepas de *Pseudomonas* spp. flageladas, por no máximo 25 minutos, que a taxa de adesão à pele de frango aumenta, de forma constante, à medida que o tempo de imersão e o número de células no meio de inoculação aumentam e que cepas flageladas tem maior capacidade de aderência do que cepas não flageladas. Eles concluíram que, como o mecanismo de fixação envolve o transporte da bactéria até a pele e depois a sua fixação, o processo de ligação da bactéria pode ser dependente da presença de flagelos. Tal afirmação, entretanto, foi contestada por McMeekin e Thomas (1978) após esses autores analisarem o efeito da motilidade na capacidade de fixação de bactérias, isoladas de amostras da água do sistema de pré-resfriamento e de carcaças resfriadas nesse sistema, e observarem que o principal fator associado ao número de bactérias retidas na pele de carcaças de frango foi a densidade populacional e não a motilidade das cepas bacterianas.

Em uma revisão realizada por Notermans *et al.* (1991) ficou evidente a complexidade desse processo uma vez que, segundo os autores, a maioria das partículas em suspensão possui uma carga de superfície, sendo assim, no processo de adesão bacteriana, forças físicas intermoleculares como interações eletrostáticas da camada dupla, forças de *Van der Waals* e contribuições entrópicas desempenham um papel importante. Como exemplo tem-se a aproximação de uma bactéria carregada negativamente de uma superfície com carga semelhante. Ainda que exista uma tendência à repulsão mútua entre as duas superfícies, energias de atração como a força de *Van der Waals* atuam neutralizando a energia de repulsão da camada dupla. Entretanto, caso esse processo esteja ocorrendo em meio aquoso, como a densidade bacteriana é próxima a da água, as forças de *Van der Waals* podem ser insuficientes para atrair as duas superfícies, sendo necessário, por exemplo, a presença de apêndices celulares, como flagelos e pili, que atuarão reduzindo a repulsão eletrostática e aumentando a energia livre disponível, o que pode ser suficiente para que o micro-organismo supere as forças de repulsão e se aproxime da superfície a ser colonizada.

### 3.2.3. Coliformes

O grupo coliforme é composto pelos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella* e *Escherichia* pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, correspondendo, aproximadamente, a 10,0% da microbiota intestinal dos animais de sangue quente (Patel *et al.*, 2014). Essa família é composta por mais de 44 gêneros bacterianos (Garrity *et al.*, 2004) como, por exemplo, *Buttiauxella*, *Raoutella*, *Proteus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Morganella*, *Yersinia*, além dos pertencentes ao grupo coliforme, abrigando espécies reconhecidas como problema sanitário como *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*, estando frequentemente associada a doenças diarreicas. No entanto, algumas espécies podem desencadear doenças extra-entéricas, agindo como patógenos oportunistas causando, por exemplo, infecções do trato urinário, pneumonia, septicemia, meningite, sendo incriminadas em, aproximadamente, 50,0% das infecções hospitalares (Guentzel, 1996; Leclerc *et al.*, 2001). Além disso, grande parcela destes micro-organismos desempenha uma importância comercial, por apresentarem a capacidade de crescimento em temperaturas de refrigeração em carnes e derivados, causando vários defeitos, tais como odores desagradáveis, presença de limo e alteração de cor. Essas espécies bacterianas estão disseminadas no ambiente, sendo encontradas em associação aos animais, fazendas e indústria, podendo contaminar toda a cadeia de processamento (Säde *et al.*, 2013).

As bactérias do grupo coliforme são caracterizadas por apresentarem-se na forma de bastonetes Gram-negativo, não esporulados, serem aeróbios ou anaeróbios facultativos, oxidase negativos e por fermentarem lactose com produção de ácido e gás a temperatura de 32-35 °C. Com exceção

do *Klebsiella*, todos os demais gêneros apresentam flagelo e apenas algumas cepas produzem cápsula. O grupo pode ser classificado em coliformes totais, caracterizados por fermentarem lactose a temperatura de 35°C, e em coliformes termotolerantes ou termotróficos que, apesar de comporem o grupo de coliformes totais, apresentam como diferencial a capacidade de fermentar lactose a temperatura de 44,5°C - 45,5°C (APHA, 1953; Frazier, 1993; Guentzel, 1996).

Apesar de residentes comuns da microbiota intestinal normal de humanos e animais de sangue quente, a maior parte das bactérias do grupo coliformes totais pode ser encontrada, também, em uma variedade de fontes não entéricas, e sua enumeração é realizada com o objetivo de avaliar as condições sanitárias dos produtos. Entretanto, ainda que altas contagens desses microorganismos possam indicar contaminação ou crescimento durante a produção, o processamento e a estocagem, a legislação brasileira estabelece como padrão microbiológico de avaliação da carne de frango, apenas a enumeração de coliformes 45°C, determinando que lotes que apresentem contagens inferiores a  $5,0 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> sejam classificados como aceitáveis, entre  $5,0 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> e  $1,0 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> de qualidade intermediária e se superior a  $10^4$  UFC g<sup>-1</sup> sejam classificados como inaceitáveis (Brasil, 2001).

O grupo dos coliformes termotolerantes, erroneamente denominados coliformes fecais, é utilizado como indicador de contaminação fecal, visto que neste grupo tem-se como principal bactéria *Escherichia coli*, espécie que tem como habitat primário o intestino de humanos e animais e que não apresenta grande capacidade de sobrevivência em ambientes fora do trato intestinal de animais de sangue quente, como água e solo (Leclerc *et al.*, 2001; Jay, 2005; Patel *et al.*, 2014; Martin *et al.*, 2016). Esta espécie é um dos patógenos entéricos mais importantes, tendo sido o principal agente incriminado em surtos alimentares no Brasil entre os anos de 2007 e 2017, incriminado em, aproximadamente, 28,0% dos casos (Guentzel, 1996; Brasil, 2018).

Existem muitas estirpes diferentes dentro da espécie *E. coli*, no entanto, apesar de algumas serem patogênicas, a maioria não é (FSIS, 2015). A presença ou não de determinados fatores de virulência é utilizado como parâmetro de classificação de *E. coli* como comensal, patogênica intestinal ou patogênica extraintestinal. As cepas associadas a doenças intestinais são agrupadas em seis patótipos, de acordo com os respectivos mecanismos de patogenicidade, sintomas clínicos provocados e sua interação com células epiteliais cultivadas *in vitro*, sendo: *E. coli* enterotoxigênico (ETEC); *E. coli* enteropatogênico (EPEC); *E. coli* enteroagregativo (EAEC); *E. coli* enteroinvasivo (EIEC); *E. coli* difuso aderente (DAEC); e *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) que inclui o grupo *E. coli* produtor de Shiga-toxina (STEC) também chamada de *E. coli* produtor de Verotoxina (VTEC) (Guentzel, 1996; Leclerc *et al.*, 2001; CDC, 2015). Associado a essa classificação, emprega-se, também, um esquema de sorotipagem das espécies de *E. coli* com base no lipopolissacarídeo somático O, flagelar H e capsular K, sendo o antígeno O utilizado para definir o grupo principal e o H para caracterização dos sorovares (Patel *et al.*, 2014).

ETEC é responsável por mais de 79 mil casos de DTA nos EUA a cada ano (CDC, 2014a). A infecção por este patótipo é caracterizada pela adesão a mucosa intestinal via fatores de colonização, também denominados adesinas, seguido da produção de toxinas termoestáveis (ST) e termolábeis (LT), que atuam no epitélio intestinal danificando as células da mucosa ou estimulando a secreção de fluidos, levando a diarreia aquosa profusa e cólicas abdominais (Evans e Evans, 1996; Nataro e Kaper, 1998), sendo este o principal agente causador da diarreia dos viajantes e de doenças diarreicas em países de baixa renda (CDC, 2014b).



O patótipo EPEC tem como característica principal a produção de lesões do tipo “*attaching and effacing*” (A/E), ou aderindo e apagando. Essas lesões destroem a borda em escova das células epiteliais do intestino e facilitam a adesão da bactéria à membrana celular do hospedeiro. Em adultos saudáveis, a diarreia induzida por EPEC pode ser iniciada por uma dose de  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC (Nisa *et al.*, 2013).

EAEC exibe um padrão característico de aderência agregativa à mucosa intestinal, com multiplicação na camada superficial e posterior produção de toxinas que lesam a mucosa intestinal, causando diarreia crônica em lactentes, crianças e pacientes imunossuprimidos nos países em desenvolvimento.

EIEC é um importante agente causador de diarreia em adultos, apresentando fatores de invasão celular, multiplicação intracelular, com conseqüente destruição e inflamação do epitélio intestinal, e difusão para células epiteliais adjacentes (Evans e Evans, 1996; Guentzel, 1996; Nataro e Kaper, 1998; CDC, 2014a).

Finalmente, EHEC é considerada a mais patogênica de todas as cepas, por provocar lesões do tipo A/E, produzir enterohemolisinas e outros fatores de virulência e, também, por produzir toxinas intimamente relacionadas à toxina produzida por *Shigella dysenteriae*, sendo conhecidas, neste caso, como STEC ou VTEC. Esta toxina é conhecida como Verotoxina, por ser letal para células Vero, e age nas células intestinais do cólon, causando colite hemorrágica com dor abdominal severa, podendo evoluir para Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), uma patologia resultante da associação de anemia hemolítica, púrpura trombocitopênica e insuficiência renal aguda (Nataro e Kaper, 1998; Forsythe, 2013).

Dentre os patótipos de *E. coli* associados a doenças intestinais, EHEC é o mais frequente nas ocorrências de surtos de origem alimentar na América do Norte, sendo responsável por cerca de 260 mil infecções, 3.600 hospitalizações e 30 mortes por ano (CDC, 2014a; WHO, 2015). Deste patótipo, *E. coli* O157:H7 é o sorotipo mais patogênico, responsável por aproximadamente 36,0% dos casos. Este sorotipo causa surtos graves de colite hemorrágica, evoluindo em cerca de 5,0-10,0% dos casos para SHU (Guentzel, 1996; CDC, 2014a; CDC, 2015). No entanto, estima-se que mais de 50 outros sorogrupos, conhecidos como não-O157, sejam responsáveis por cerca de dois terços das doenças por STEC porém, devido a maior dificuldade para sua identificação, em comparação à STEC O157, os dados sobre a ocorrência de STEC não-O157 nos Estados Unidos são subestimados (CDC, 2015).

Com relação aos dados dos surtos de DTAs ocorridos no estado do Paraná, no período entre os anos de 2005 a 2008, *E. coli* foi o agente etiológico mais frequente nos 106 casos notificados, sendo encontrado em 47,2% das amostras. No estado de Minas Gerais, no período de 2010 a 2015, foram notificados 340 surtos, que resultaram em 6.174 doentes e 893 hospitalizações, sendo que, dos 638 alimentos analisados, 97 (15,2%) foram considerados positivos para *E. coli* (Almeida *et al.*, 2013; Faúla *et al.*, 2015; Faúla, 2016).

Cossi *et al.* (2012), avaliando a qualidade microbiológica de 30 carcaças de frango, provenientes de indústria sob inspeção federal e comercializadas de forma refrigerada pelos mercados da cidade de Viçosa, MG, encontraram contagens para coliformes 35°C entre  $1,0 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> e  $2,9 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> e contagens de *E. coli* variando entre  $1,0 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> a  $5,9 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>.

Ao avaliar 180 carcaças de frango de corte coletadas em diferentes estabelecimentos sob inspeção federal e estadual, no estado de Minas Gerais, Lima (2012) observou a presença de coliformes 45°C em 90,0% das amostras e em 100% dos estabelecimentos, sendo que em 35,0% das amostras a contaminação encontrada estava fora do padrão estabelecido pela legislação (Brasil, 2001) sendo, portanto, impróprias para consumo.

Menezes (2013) avaliando 240 amostras de carcaças de frangos de corte coletadas em abatedouros de diversas regiões no estado de Minas Gerais encontrou 82 (34,2%) amostras positivas para coliformes. Dessas amostras, 13,0% apresentaram contagens para coliformes 45°C superiores ao preconizado pela legislação brasileira (Brasil, 2001) e 37,8% das amostras apresentaram contagens de coliformes 35°C entre  $1,0 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> e  $2,5 \times 10^8$  UFC g<sup>-1</sup>.

Simas *et al.* (2013) ao analisarem 120 amostras de carcaças de frangos, coletadas logo após a etapa de pré-resfriamento, entre os meses de outubro de 2009 e abril de 2010, em um abatedouro frigorífico sob inspeção federal no estado de Minas Gerais, observaram uma contagem média para coliformes 45°C entre  $2,4 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> e  $1,3 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>. Andrade (2014) ao analisar 48 amostras de carcaças de frangos de corte, coletadas após o pré-resfriamento em um abatedouro do mesmo estado, observou contagens inferiores a  $<1,0 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> para coliformes 35°C e 45°C.

#### **3.2.4. *Staphylococcus* spp.**

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, pertencentes à família *Staphylococcaceae*, apresentam-se como bactérias esféricas (cocos) Gram-positivo, com aproximadamente 1µm de diâmetro, aeróbias ou anaeróbias facultativas, catalase positivas, não formadoras de esporos e que ocorrem individualmente, em pares, em pequenas cadeias ou como agrupamentos em arranjos semelhantes a cachos de uva. Ocasionalmente observa-se a presença de cápsula em culturas jovens, mas geralmente está ausente na fase estacionária (Foster, 1996; Jay, 2005; Gillaspay e Iandolo, 2014).

O gênero é composto por mais de 50 espécies e numerosas subespécies, divididas em *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) com base na sua capacidade de coagulação do plasma sanguíneo. Os SCP produzem uma enzima chamada coagulase, capaz de converter o fibrinogênio do plasma sanguíneo em fibrina, e incluem as espécies *S. aureus* spp. *aureus*, *S. aureus* spp. *anaerobius*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. delphini*, *S. lutrae* e *S. schleiferi* spp. *coagulans*. Os SCN não produzem coagulase e apresentam-se como um grupo heterogêneo, compreendendo as demais espécies do gênero (Hennekinne *et al.*, 2012). A pesquisa da enzima coagulase é uma das provas mais utilizadas para identificação do risco de intoxicação alimentar por ser correlacionada à capacidade de produção de enterotoxinas pelos micro-organismos, ainda que esta relação não seja absoluta. Várias espécies de SCN, consideradas por muito tempo bactérias não patogênicas, tem tido seu papel patogênico reconhecido e estudado uma vez que, apesar de serem coagulase negativo, muitas cepas podem apresentar genes codificadores de enterotoxinas, como *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. haemolyticus* e *S. simulans* (Bautista *et al.*, 1988; Su e Wong, 1997; Cunha *et al.*, 2006a; Veras *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2011).

O primeiro relato de intoxicação alimentar causada por *Staphylococcus* spp. foi realizado por Vaughan e Sternberg, ao investigarem um surto causado por queijo contaminado em Michigan (EUA), 1884. No entanto, foi Barber quem demonstrou claramente a associação dessas

bactérias às doenças veiculadas por alimentos e Dack quem confirmou que esta doença era causada por uma enterotoxina (Adams *et al.*, 2016). Dentro do gênero, *S. aureus* é a principal espécie relacionada aos casos de intoxicação alimentar, sendo incriminada em, aproximadamente, 98,0% dos surtos (Franco e Landgraf, 2008). Esses micro-organismos exibem capacidade de multiplicação em uma ampla faixa de temperatura (7 a 45,5°C) e pH (4,2 a 9,3), sendo facilmente encontrados no ar, poeira, esgoto, água, superfícies ambientais e nas narinas, pele e cabelos de humanos e animais de sangue quente e, aproximadamente, 30,0% a 50,0% da população humana é portadora assintomática desse micro-organismo. Essas características favorecem a contaminação e, também, ao crescimento desta bactéria em uma diversificada gama de matérias primas, tendo destaque as que requerem maior manipulação durante o processo de obtenção como, por exemplo, a carne de frango (Le Loir *et al.*, 2003).

*S. aureus* produz mais de 20 tipos de enterotoxinas quando em temperaturas entre 10°C e 46°C e pH entre 5 e 9,6 (Schelin *et al.*, 2011). Apesar de serem semelhantes em composição e atividade biológica, as Enterotoxinas Estafilocócicas (SE) apresentam diferenças sorológicas, sendo classificadas em diferentes tipos com base em suas propriedades antigênicas. A nomenclatura dessas substâncias é realizada com base em letras do alfabeto (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ) sendo as do tipo A e D as mais frequentes em surtos alimentares no Brasil, EUA, Reino Unido, Taiwan, Coréia e França. Essas toxinas são altamente estáveis e resistentes ao calor, além de resistirem ao congelamento, ressecamento, a ação de enzimas proteolíticas e a baixo pH (Le Loir *et al.*, 2003; Argudín *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2016).

Nos Estados Unidos, entre os anos de 1975 e 1982, 5,5% dos casos de intoxicação estafilocócica notificados foram devido à carne de frango. Na Inglaterra e País de Gales, entre 1976-1982, esse valor foi ainda maior, cerca de 29,0% (Genigeorgis, 1989; Bennett *et al.*, 2013). No Reino Unido, os casos de intoxicação estafilocócica veiculadas por carne de aves ou por refeições à base de carne de aves, foram de 22,0% entre os anos de 1969 e 1990 (Wieneke *et al.*, 1993).

Martins *et al.* (2013), analisando 30 amostras de carne de frango, sendo 15 de carnes congeladas e 15 de carnes resfriadas, em duas cidades do Rio Grande do Sul, isolaram SCP em 66,7% das amostras, sendo que a média das contagens dos frangos congelados foi menor ( $3,4 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup>) que a média encontrada nas amostras sob refrigeração ( $5,3 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>) e a espécie *S. aureus* foi a mais prevalente (62,0%), tanto nas amostras congeladas quanto nas resfriadas.

Menezes (2013) avaliou 240 amostras de carcaças de frangos de corte, coletadas em vários abatedouros do estado de Minas Gerais, e encontrou 100% das amostras positivas para *Staphylococcus* spp., sendo que 23,8% eram SCP e 76,2% SCN e a contagem em 69,0% das carcaças analisadas apresentaram valores acima de  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup>. Segundo a pesquisadora, esses altos índices causam preocupação, uma vez que a presença do *Staphylococcus* spp. indica falhas no processo de produção e apresentam risco de desenvolvimento destes micro-organismos com produção de enterotoxinas durante o processo de preparo da carne de frango para o consumo.

Em uma revisão dos surtos notificados ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, Bennett *et al.* (2013) observaram que entre os anos de 1998 e 2008, 37,0% de todas as intoxicações alimentares bacterianas foram causadas por *S. aureus* e carnes de aves ou vermelhas foram os alimentos mais envolvidos nos surtos por este patógeno. No entanto, os pesquisadores destacam que, esses números podem ser ainda maiores tendo em vista o fato de que doenças esporádicas causadas por este micro-organismo não são notificadas. No Brasil,

entre os anos de 2007 e 2017, *S. aureus* foi responsável por 18,6% das doenças bacterianas de origem alimentar (Brasil, 2018).

Faúla *et al.* (2015) analisaram os dados epidemiológicos dos surtos de DTAs ocorridos em Minas Gerais no período de 2010 a 2014 e observaram que dos 153 alimentos que apresentaram algum tipo de contaminação, SCP foi o agente mais prevalente, correspondendo a 33,2% dos isolados, sendo que 55,8% dessas amostras apresentaram contagens superiores a  $10^5$  UFC/g. Além disso, em 12,5% dos alimentos foi encontrado a presença de SE.

Após coletar 288 amostras de carcaças de frango de corte em diferentes turnos de trabalho em um abatedouro sob inspeção veterinária oficial, logo após o pré-resfriamento, Cintra *et al.* (2016) observaram contagens médias de *Staphylococcus* spp. variando entre  $<1,0 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> e  $3,0 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>. Para os pesquisadores, as baixas contagens encontradas refletiram a eficiência dos programas de controle da qualidade adotados pela empresa.

### 3.2.5. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* spp. pertence a família *Enterobacteriaceae* e compreende duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*. Uma terceira espécie, *S. subterranea*, foi proposta em 2004 (Shelobolina *et al.*, 2004), mas trabalhos posteriores mostraram que ela não pertencia ao gênero (Grimont e Weill, 2007; Hata *et al.*, 2016). Ainda que todos os sorotipos apresentem patogenicidade ao ser humano, dentre as duas espécies do gênero, a primeira é um patógeno encontrado predominantemente em animais de sangue frio, apesar de poder infectar humanos ainda que raramente, sendo a segunda, *S. enterica*, a que abriga a grande maioria dos sorovares associados a doenças em humanos, sendo responsável por causar uma DTA conhecida como salmonelose (Fookes *et al.*, 2011). As bactérias deste gênero apresentam-se como bacilos não esporulados, Gram-negativo, anaeróbios facultativos, móveis, produtores de ácido e gás a partir de glicose (exceto *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que são imóveis e somente 5,0% produzem gás) e mesófilos, com temperatura ótima para crescimento entre 35 e 40°C (Bailey *et al.*, 2010; CDC, 2011).

A espécie *S. enterica* predomina em animais de sangue quente e é dividida em seis subespécies, sendo elas *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (Garrity *et al.*, 2008). Destas subespécies, *S. enterica* subsp. *enterica* é a mais importante para a saúde pública por ser a responsável por aproximadamente 99,0% das infecções decorrentes de *Salmonella* spp. em humanos e animais. Esta subespécie, por sua vez, é dividida em sorogrupos, semelhante às demais enterobactérias, e os sorogrupos são classificados em mais de 2500 sorotipos distintos, dos quais menos de 100 causam doenças em humanos (Brenner *et al.*, 2000; Grimont e Weill, 2007; Painter *et al.*, 2013; FSIS, 2017). Os sorotipos *S. Typhi* e *S. Paratyphi* são patógenos específicos de seres humanos, causando infecções sistêmicas e febre tifoide, e os sorotipos *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Javiana* e *S. Heidelberg* são os frequentemente associados às DTAs, incriminados em, aproximadamente, 16,0%, 16,0%, 10,0%, 7,0% e 4,0% dos casos, respectivamente, tendo sido os principais causadores das enterocolites veiculadas por alimentos nos EUA entre os anos de 1996 e 2016 (CDC, 2017a).

Salmonelas causadoras de enterocolites estão amplamente distribuídas no ambiente, como água, solo, carne e vísceras cruas, residindo primariamente no trato intestinal de aves, mamíferos e dos seres humanos, sendo esta a principal fonte de contaminação. Podem causar desde uma

infecção intestinal branda até uma infecção sistêmica grave, sendo responsáveis por, aproximadamente, 93,8 milhões de casos de gastroenterites aguda e 155.000 mortes no mundo a cada ano, exercendo um impacto significativo na saúde pública e na economia da sociedade (FAO/WHO, 2015).

Os animais de produção são os principais vetores dessas bactérias, e as aves têm papel de destaque na epidemiologia das salmonelas entéricas.. Há mais de meio século bactérias do gênero *Salmonella* e aves foram relacionadas epidemiologicamente e economicamente (Buxton, 1957). Por serem portadores assintomáticos, as aves podem veicular esse micro-organismo ao longo de toda a cadeia produtiva, contaminando outras carcaças, equipamentos e utensílios assim como, podem contaminar outros produtos alimentícios devido a práticas higiênicas e sanitárias inadequadas durante o manuseio, cozimento ou armazenamento (Mead, 2004; Buncic e Sofos, 2012). Dados do CDC mostram que no ano de 2013, *Salmonella* spp. foi responsável por 62,0% dos surtos, 71,0% das intoxicações e 74,0% das internações devido doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (CDC, 2013). Entre os anos de 2000 a 2017, *Salmonella* spp. foi o segundo micro-organismo mais frequente nos casos de DTAs no Brasil, indicado em aproximadamente 35,0% dos casos. Vale ressaltar que menos de 30% dos surtos de origem alimentar que ocorreram neste período tiveram os agentes etiológicos identificados (Brasil, 2017).

Tendo em vista a importância da cadeia de produtos avícolas na transmissão deste patógeno, o governo brasileiro, com o objetivo de reduzir a incidência destas bactérias nas aves comerciais, regulamentou em 2003 a Instrução Normativa nº 78, que tem como objetivo promover o monitoramento sanitário dos plantéis de reprodução com vistas a certificar os núcleos e as granjas avícolas como livres para *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* e livres ou controladas para *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (Brasil, 2003). Além disso, a Instrução Normativa nº 20 de 2016 regulamentou o “Programa de Redução de Patógenos – monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos e perus”. Esse programa prevê a análise laboratorial sistemática e contínua de carcaças de frangos e perus *in natura*, em todos os estabelecimentos sob registro no Serviço de Inspeção Federal, para pesquisa de *Salmonella* sp. (Brasil, 2016).

Outra ação do governo brasileiro é o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF) que tem como objetivo realizar o monitoramento da prevalência e resistência a antimicrobianos das bactérias do gênero *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp. em carcaças de frango congeladas coletadas no comércio. O último relatório do PREBAF analisou 2.710 unidades amostrais de frangos coletados em 14 estados brasileiros, entre os anos de 2004 e 2006, e os resultados encontrados em relação à *Salmonella* spp. indicaram uma prevalência média de 3,03%, destacando-se os sorotipos *S. Enteritidis* (48,8%), *S. Infantis* (7,6%), *S. Typhimurium* (7,2%) e *S. Heidelberg* (6,4%) (Brasil, 2012). *S. Enteritidis* também foi o sorotipo mais frequente em isolados clínicos em humanos (67,4%) entre os anos de 1996-2003 no estado de São Paulo (Fernandes *et al.*, 2006).

Duarte *et al.* (2009) analisando 260 carcaças de frangos de corte, provenientes de cinco abatedouros localizados no Nordeste do Brasil, observaram uma prevalência de 9,6% para *Salmonella* spp. sendo *S. Enteritidis* (25,0%) o sorotipo mais frequente. Resultados semelhantes foram observados por Borsoi *et al.* (2010) ao encontrar uma incidência de 12,2% para *Salmonella* spp. após analisarem 180 carcaças refrigeradas coletadas no varejo do estado do Rio Grande do Sul, sendo o sorotipo *S. Enteritidis* (31,8%) o mais prevalente.

Alali *et al.* (2012) estudaram a incidência de *Salmonella* em 698 amostras de carcaças de frangos comercializadas em diferentes tipos de lojas e temperaturas de armazenamento e criadas em diferentes sistemas de produção em três regiões distintas da Rússia. Os pesquisadores encontraram uma incidência total de 31,5% carcaças contaminadas por *Salmonella* spp., sendo observado diferenças em relação ao local de aquisição das amostras (28,8% nos hipermercados, 31,9% nos supermercados, 44,3% em supermercados independentes, 42,9% em minimercados independentes e 26,6% em mercados populares ao ar livre) e ao sistema de produção (34,3% em frangos produzidos por empresas integradas em comparação com 22,9% em frangos produzidos por empresas não integradas). Não foram observadas diferenças na contaminação por *Salmonella* em relação ao sistema de criação das aves (convencional ou *free range*) e em relação à temperatura de armazenamento no varejo (congelado ou resfriado).

Siriken *et al.* (2015) analisaram 150 amostras de carne de frango (75 carcaças e 75 porções de **carne**) coletadas no varejo da província de Samsun, Turquia, entre os anos de 2008 e 2009. *Salmonella* spp. foram detectadas em um total de 64 (42,7%) amostras de carne de frango (sendo em 40 [53,3%] carcaças e em 24 [32,0%] das amostras de porções de carne). Para os pesquisadores, a taxa de isolamento alta de *Salmonella* spp. nas amostras de carne de frango ratificam o fato de que a carne desses animais é uma das fontes mais importantes de salmonelose humana.

### 3.2.6. Micro-organismos psicrotróficos

As bactérias associadas aos alimentos podem ser classificadas em três grupos principais considerando-se a faixa de temperatura na qual apresentam maior taxa de multiplicação celular. Os micro-organismos designados como psicrófilos são aqueles que apresentam como temperatura ótima para crescimento valores entre 12°C e 15°C; os que apresentam como temperatura ótima entre 30°C e 40°C são denominados mesófilos e os que apresentam como temperatura ótima 55°C a 65°C são referidos como termófilos. No entanto, além dessa terminologia, os micro-organismos tidos como mesófilos podem ser ainda designados com base em sua capacidade de crescimento, mesmo que reduzido, em temperaturas inferiores a 20°C ou superiores a 40°C, ou seja, distintas daquela tida como ótima para sua multiplicação sendo, nestes casos, chamados de psicrotróficos e termotróficos, respectivamente (Franco e Landgraf, 1996; Jay, 2005).

Os principais gêneros bacterianos patogênicos e deterioradores, isolados em carnes de frango, possuem espécies classificadas como psicrotróficos e, quanto maior o predomínio destas bactérias na microbiota inicial, mais rápido será o processo de deterioração da carne e de seus derivados (Arnaut-Rollier, 1999). Dentre os gêneros que apresentam bactérias psicrotróficas podem ser citados *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Carnobacterium* spp., *Brochothrix* spp., *Alcaligenes* spp., *Serratia* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., e *Yersinia* spp. Esses micro-organismos, quando encontrados nas carcaças logo após o processo de abate, são oriundos, principalmente, da microbiota residente nos animais vivos, externa e internamente, da água de abastecimento, dos equipamentos e dos tanques de refrigeração (Russell, 2001; Rouger *et al.*, 2017).

A cada ano aproximadamente 2,0% a 4,0% da carne de frango produzida nos Estados Unidos é perdida em consequência da deterioração, o que equivale a uma perda aproximada de US\$300 a

US\$600 milhões anualmente (Russell, 2001). O processo de deterioração mediado por bactérias leva ao surgimento de alterações visíveis, como a produção de limosidade; alterações de textura, devido à degradação proteica; e sensoriais, com a produção de odor e sabor desagradável (Gram *et al.*, 2002).

Dentre as bactérias psicrótróficas, as do gênero *Pseudomonas* spp. são as principais responsáveis pelo processo de deterioração de carnes refrigeradas (ICMSF, 2005). Este gênero, pertencente à família *Pseudomonadaceae*, é composto por mais de 200 espécies que têm como características comuns apresentarem-se na forma de hastes retas ou levemente curvas, possuem flagelo, não formam esporos, serem aeróbios estritos e Gram-negativo. Essas bactérias podem ser encontradas em uma grande variedade de ambientes como solo, plantas, animais e nos seres humanos, e podem atuar como agentes patogênicos oportunistas em humanos, plantas e animais, como bactérias ubíquas na natureza ou como agente deteriorante de carnes e derivados (Özen e Ussery, 2011; Palleroni, 2013). Dentre as espécies, *P. fragi*, *P. lundensis* e *P. fluorescens* são frequentemente isoladas em carnes de aves (Rouger *et al.*, 2017), já as espécies associadas a infecções em humanos incluem *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. stutzeri* e *P. maltophilia* (Iglewski, 1996). *P. aeruginosa* é uma causa comum de infecções em ambiente hospitalar, associada a infecções sanguíneas, do trato urinário e de ambiente cirúrgico. Estima-se que este patógeno seja responsável por, aproximadamente, 51 mil infecções e 400 mortes por ano nos EUA sendo que, cerca de 13% das infecções graves associadas a esse micro-organismo, são resistentes a múltiplos fármacos (CDC, 2013).

Daud *et al.* (1979) avaliando a diversidade de micro-organismos presentes na pele da coxa e do peito de carcaças de frangos, coletadas ao final do *chiller* e armazenadas a 2°C, observaram, no dia 0, uma contagem de 10<sup>4</sup> UFC/16 cm<sup>2</sup> para micro-organismos mesófilos e 10<sup>3</sup> UFC/16 cm<sup>2</sup> para psicrótróficos, sendo o gênero *Micrococcus* o mais abundantes (30%), seguido dos gêneros *Pseudomonas* (26%) e *Flavobacterium* (18%). A partir do 4º dia as contagens bacterianas elevaram-se consideravelmente, com valores superiores a 10<sup>7</sup> UFC/16 cm<sup>2</sup> no 8º dia de armazenamento e 10<sup>10</sup> UFC/16 cm<sup>2</sup> no 16º dia, para ambos os grupos bacterianos. Entretanto, diametralmente, os pesquisadores observaram uma redução na diversidade bacteriana, com predominância do gênero *Pseudomonas* em 96% das bactérias identificadas.

Arnaut-Rollier *et al.* (1999) com o objetivo de identificar as espécies de *Pseudomonas* spp. predominantes na microbiota de aves de granja, realizaram a identificação de 720 isolados bacterianos cultivados a partir de 18 carcaças de aves coletadas no final na linha de produção em duas ocasiões distintas e armazenadas sob refrigeração (3 ± 0,5°C). Os pesquisadores realizaram análises microbiológicas até o oitavo dia de armazenamento (dias 0, 6 e 8) das carcaças, e observaram um aumento significativo na incidência destes micro-organismos entre os dias 0 (20,0%) e o dia 8 (90,0%) de armazenamento. Em relação às espécies identificadas, no dia zero *P. fluorescens* correspondeu a 24,9% dos isolados, seguida por *P. fragi* (13,7%) e *P. marginalis* (11,4%). No oitavo dia de armazenamento, 29,2% dos isolados foram identificados como *P. fragi* e 25,7% como *P. fluorescens*.

Mellor *et al.* (2011) encontraram contagens médias de 2,6 x 10<sup>7</sup> UFC g<sup>-1</sup> para *Pseudomonas* spp. em pele de 20 coxas de frango adquiridas no varejo na cidade de Brisbane, Austrália, e armazenadas aerobicamente sob refrigeração por sete dias.

*Shewanella putrefaciens*, também denominada *Pseudomonas putrefaciens*, é um bacilo Gram-negativo, saprófita, pertencente à família *Vibrionaceae*, caracterizado por produzir sulfeto de

hidrogênio e estar amplamente distribuídos na natureza. Esse micro-organismo é potencial patógeno para pacientes imunocomprometidos, tendo como fatores predisponentes à infecção, doenças hepatobiliares e vascular periférica, úlceras crônicas das pernas e a falta de higiene. Entretanto, embora uma série de síndromes clínicas tenha sido atribuída a essa bactéria (septicemia, infecção cutânea e de tecido mole, peritonite, etc.), o seu papel patogênico ainda permanece em grande parte indefinido (Brink *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Sharma e Kalawat, 2010).

Outro gênero frequentemente encontrado em carnes de frango é o *Aeromonas* spp., pertencente à ordem *Aeromonadales* e família *Aeromonadaceae*, formado por 19 espécies e 11 subespécies (Garrity *et al.*, 2004). Dentre as espécies, cinco (*A. hydrophila*, *A. veronii*, *A. caviae*, *A. jandaei* e *A. schubertii*) são reconhecidas como patógenos humanos e uma (*A. salmonicida*) como patógeno específico de peixes (Janda e Abott, 1998). Esses micro-organismos apresentam-se como bacilos Gram-negativo, oxidase positivo, anaeróbio facultativo e mesófilos, com temperatura ótima para crescimento entre 22 – 35°C, apesar de algumas espécies apresentarem crescimento na faixa entre 0 – 45°C (Janda e Abbott, 2010). Podem ser isolados de aves, habitats aquáticos, alimentos, animais domésticos, espécies de invertebrados e do solo e apresentam a capacidade de crescimento em alimentos crus, cozidos e processados, em uma ampla faixa de pH (4,5 a 9) e mesmo que armazenados sob refrigeração (Devlieghere *et al.*, 2000; Isonhood e Drake, 2002; OMS, 2011). Vários fatores estão associados à patogenicidade de *Aeromonas* spp. como, por exemplo, a produção de hemolisina, enterotoxina, citotoxinas, endotoxinas, adesinas, flagelos entre outros (Daskalov, 2006), no entanto, pouco se sabe acerca do real impacto das bactérias deste gênero em relação aos casos de doenças transmitidas por alimentos (Igbiosa *et al.*, 2012). Para Bin Kingombe *et al.* (2004) essa ausência de informações pode ser devido, principalmente, a ausência de um método rápido e simples que possibilite a detecção e diferenciação adequada das cepas patogênicas das não patogênicas. No entanto, mesmo com dados escassos, essas bactérias têm sido associadas a várias doenças em humanos e animais, sendo implicadas como causadoras de gastroenterites e infecções extra-intestinais como, por exemplo, pneumonia, SHU, peritonites, infecções de feridas, sepses biliares e septicemias (Pereira *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2009).

Neyts *et al.* (2000) analisaram cinco amostras de carnes de aves, 14 de carne vermelha e três derivados cárneos, provenientes de supermercados na cidade de Flandres, Bélgica, quanto à prevalência de *Aeromonas* spp. e encontraram 83,3%, 64,3% e 66,7% de amostras positivas para estes micro-organismos, respectivamente. Um total de 16 isolados bacterianos foram identificados geneticamente, sendo observada uma predominância das espécies *A. hydrophila* HG3 (37,0%), *A. veronii* biovar sobria HG8 (19,0%) e *A. caviae* complex HG4 e HG5A (12,0%). Para os pesquisadores, tendo em vista o fato de que a maioria das cepas virulentas do gênero pertencem às espécies genômicas *A. hydrophila* HG1, *A. caviae* HG4 e *A. veronii* biovar sobria (HG8), a presença dessas bactérias nas carnes disponíveis no varejo indica que estes produtos são possíveis veículos de gastroenterites mediadas por *Aeromonas* spp.

Costa e Rossi Júnior (2002) analisaram 200 amostras de material proveniente de diferentes pontos da linha de processamento de um abatedouro de frangos localizado no estado de São Paulo quanto à presença de bactérias do gênero *Aeromonas* e observaram que apenas as amostras provenientes da água de abastecimento e da água do tanque de esquadra foram negativas para este micro-organismo. Os demais pontos de coleta (penas, fezes, carcaça não eviscerada, carcaça eviscerada, água de pré-resfriamento e carcaça resfriada) apresentaram alta incidência dessas bactérias, na proporção de 36,0%, 56,0%, 72,0%, 72,0%, 80,0% e 72,0%.



respectivamente. As espécies *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* e *A. veronii* foram encontradas em todas as etapas avaliadas. Para os pesquisadores, a presença dessas bactérias nas fezes das aves sugere que estas são portadoras assintomáticas do micro-organismo, sendo uma possível fonte de contaminação dos demais animais durante o transporte e processamento.

Bin Kingombe *et al.* (2004) identificou a presença de genes para produção de hemolisina em 100% dos cinco isolados de *Aeromonas* spp. cultivados a partir de amostras de carne de aves (frango, avestruz e peru). Ainda que a confirmação da patogenicidade de isolados bacterianos seja realizada, geralmente, a partir de ensaios biológicos, para os pesquisadores a reação positiva quanto à presença de genes para produção de fatores de virulência pode ser considerada uma indicação da potencial patogenicidade destes micro-organismos.

### 3.2.7. *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria*, pertencente à família *Listeriaceae*, é composto por vinte espécies: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. costericensis*, *L. denitrificans*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii* (*L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*), *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* e *L. welshimeri* (Low e Donachie, 1997; Graves *et al.*, 2010; Leclercq *et al.*, 2010; Euzéby, 2018). Essas bactérias apresentam-se como bastonetes Gram-positivo, longos, não esporulados, catalase positivo, oxidase negativo, produtoras de ácido lático a partir da glicose e móveis por meio de flagelos peritríquios, com movimento característico denominado tombamento (Jay, 2005). De forma ubíqua, representantes deste gênero alternam entre o saprofitismo e a virulência (David e Cossart, 2017) sendo encontrados no solo, vegetação, esgoto, água, animais, carnes frescas e congeladas, equipamentos e instalações de processamento e nos seres humanos (McLauchlin *et al.*, 2004). Esses micro-organismos apresentam forte tolerância a ambientes ácidos, podendo sobreviver a pH tão reduzidos quanto 4,0 ou, ainda, inferiores a este, caso sejam adaptadas.

Das espécies citadas, *L. grayi* não é encontrada em produtos alimentícios e *L. monocytogenes* é a de maior importância para a saúde pública, por ser o principal agente causador de uma infecção veiculada por alimentos conhecida como listeriose. Apesar de apresentar baixa incidência, a listeriose exibe uma alta taxa de mortalidade (40,0%) e pode deixar graves sequelas nos sobreviventes. Os mais afetados pela doença são os idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos e pessoas com sistema imunológico enfraquecido. A infecção pode manifestar-se com sintomas gastrointestinais ou gripais leves ou com alterações mais graves como, por exemplo, septicemia, infecções no sistema nervoso central, no coração e em outros órgãos, além de abortos, natimortos ou partos prematuros em gestantes (McLauchlin *et al.*, 2004; Reiter *et al.*, 2005; CDC, 2017b).

A incidência da *L. monocytogenes* no ambiente industrial e nos alimentos é de difícil controle, sendo comum a sua presença na carne crua de frangos. Além de apresentar capacidade de crescimento em baixas temperaturas, esse micro-organismo é muito resistente a várias condições ambientais adversas, como alto teor de sal ou acidez, baixa umidade ou baixo teor de oxigênio. Além disso, estas bactérias são capazes de formar biofilmes e de entrar em estado de latência, estratégias de sobrevivência em longo prazo que permitem ao patógeno resistir aos processos de limpeza e sanitização aplicados pela indústria, contaminando facilmente os produtos de origem animal. Dessa forma, embora o cozimento normal seja capaz de destruí-los, o perigo associado à presença deste micro-organismo nas carnes de frango está, principalmente,

na ocorrência de recontaminação nas fábricas de produtos processados e na contaminação cruzada na cozinha, onde ele pode se espalhar para alimentos cozidos ou outros itens, como vegetais, e se desenvolver mesmo sob condições de frio (Mead, 2004; De Noordhout *et al.*, 2014; Buchanan *et al.*, 2017).

A classificação sorológica das espécies de *Listeria* spp. é realizada a partir de anticorpos monoclonais e policlonais que tem como alvo antígenos somáticos O e flagelares H presentes na superfície bacteriana. Com base na identificação destes antígenos específicos, *L. monocytogenes* é dividida em 12 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e e 7). Ainda que todas as cepas de *L. monocytogenes* sejam consideradas patogênicas ao homem, os sorotipos mais prevalentes nos casos de listeriose humana são os 1/2a, 1/2c, 1/2b e 4b, responsáveis por, aproximadamente, 98,0% dos casos (Wiedmann *et al.*, 1997; Morobe *et al.*, 2012).

Estima-se que *L. monocytogenes* tenha causado mais de 23 mil casos de listeriose no mundo em 2010, com mais de 5.463 mortes (De Noordhout *et al.*, 2014). Entre os anos de 2010 e 2014, *L. monocytogenes* foi responsável por 12 surtos com 57 mortes nos Estados Unidos, sendo considerado o patógeno mais mortal entre os isolados em surtos de doenças de origem alimentar neste país (Crowe *et al.*, 2015). Dos 1.763 casos confirmados de listeriose na União Europeia em 2013, houve uma taxa média de hospitalização de 99,1%, sendo esta a zoonose com maior proporção de casos hospitalizados (Buchanan *et al.*, 2017). Porém, a despeito da grande importância sanitária desta bactéria, e do fato da carne de frango e seus derivados poderem atuar como veículo de contaminação, não há nenhum programa para o controle ou monitoramento deste micro-organismo nestes animais e nos seus produtos, por parte do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), com exceção apenas de produtos de origem animal prontos para o consumo como, por exemplo, salsichas, presuntos e apresuntados, os quais possuem legislação específica para monitoramento desse patógeno (Brasil, 2009). Da mesma forma, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabeleceu a pesquisa de *L. monocytogenes* (ausência em 25g) apenas para queijos de média, alta e muito alta umidade, não havendo padrão para os demais produtos de origem animal (Brasil, 2001).

Ao avaliar a ocorrência de *Listeria* spp. em 30 amostras de carnes de frango adquiridas no comércio varejista da cidade de Campinas, sendo 10 amostras de peito resfriado e 20 amostras de carcaça resfriada, Kabuki (1997) observou uma contaminação por este gênero em 96,7% das amostras analisadas e em 70,0% delas a presença de *L. monocytogenes*.

Barbalho *et al.* (2005) analisaram um total de 121 amostras provenientes de carcaças de frangos (66), da água do estabelecimento (18) e de manipuladores (37), coletadas em diferentes etapas do processo de abate em um frigorífico abatedouro localizado no estado da Bahia, quanto à presença de bactérias do gênero *Listeria* e encontraram uma incidência de 47,0% de *Listeria* spp., sendo que as carcaças coletadas após o processo de embalagem foram as que apresentaram a maior porcentagem de contaminação (76,2%) e, também, as únicas nas quais se detectou a presença de *L. monocytogenes* (14,3%). Aproximadamente 46,0% das amostras das mãos e luvas dos manipuladores apresentaram contaminação por *Listeria* spp. e em 12,0% *L. monocytogenes* estava presente. Em nenhuma das amostras coletadas da água do *chiller* e do pré-*chiller* foi detectada a presença deste micro-organismo. Para os pesquisadores, os resultados demonstraram a potencial contribuição dos funcionários no processo de contaminação cruzada dos produtos.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de *Listeria* spp. na cadeia produtiva de frangos no estado do Rio Grande do Sul, Nalério *et al.* (2009) analisaram 243 amostras provenientes de estabelecimentos avícolas, abatedouros e de carcaças resfriadas comercializadas neste estado, e encontraram uma incidência de *Listeria* spp. de 38,3%, sendo que 30,4% das amostras foram positivas para *L. innocua*, 12,7% para *L. monocytogenes* e 0,4% para *L. seeligeri*. *L. monocytogenes* foi detectada em 33,3% das amostras de carcaças resfriadas, refletindo a disseminação deste patógeno dentro das indústrias, bem como a dificuldade de sua eliminação do ambiente industrial. O não isolamento de *L. monocytogenes* nos animais na plataforma de desembarque e sangria, e a sua posterior presença no produto final evidenciaram a importância da contaminação cruzada dentro da planta de processamento. Os pesquisadores destacaram ainda que, apesar de *L. monocytogenes* ser a principal espécie patogênica para humanos dentro deste gênero, a identificação de outras espécies é um bom indicador da presença deste patógeno, além de sinalizar falhas nos processos de limpeza e sanitização. No que diz respeito às cepas de *L. monocytogenes* encontradas neste estudo, 51,6% pertenciam ao sorotipo 1/2b, 22,5% ao sorotipo 4e, 16,1% ao sorotipo 1/2a, 6,4% ao sorotipo 4b e 3,2% ao sorotipo 1/2c. Dessa forma, mais de 70,0% das cepas pertenciam aos principais sorotipos causadores de listeriose em humanos (4b, 1/2a e 1/2b), sendo motivo de preocupação do ponto de vista de saúde pública.

### 3.3. Descontaminantes utilizados em carcaças de frango

Altas cargas microbiológicas nas carcaças de frango acarretam em uma redução da vida de prateleira do produto, além de constituírem um problema de saúde pública devido à possibilidade da transferência desses micro-organismos para os seres humanos através da produção, manipulação e consumo da carne de frango e seus produtos derivados (Nørrung e Buncic, 2008). Dessa forma, os métodos de descontaminação da carne de aves devem ter como objetivo complementar as boas práticas de produção animal implementadas pela indústria frigorífica, com vistas a prevenir ou controlar o crescimento dos micro-organismos patogênicos e deteriorantes, e não devem ser utilizados como forma de mascarar falhas higiênicas que possam ocorrer durante o processamento do animal (Bellaver e Scheuermann, 2004; Alonso-Hernando *et al.*, 2015).

Assim, têm-se pesquisado exaustivamente métodos de descontaminação que possam ser empregados durante o processamento tecnológico das carcaças de animais de açougue e que promovam a redução e/ou eliminação de bactérias presentes nas carcaças de frango. Esses métodos podem ser divididos em químico, físico ou a combinação dos dois tipos (Quadro 1). Dentre os métodos químicos podem ser citados o cloro, ácidos orgânicos, fosfatos inorgânicos, conservantes orgânicos, bacteriocinas e agentes oxidantes e, em relação aos métodos físicos, tem-se os tratamentos à base de água, irradiação, ultrassom, baixas temperaturas e luz UV (Bolder, 1997; Loretz *et al.*, 2010). Tais intervenções devem ser seguras, econômicas, de fácil aplicação durante o abate e processamento das aves, não devem gerar resíduos tóxicos para o meio ambiente, nem alterar as propriedades sensoriais dos alimentos e devem ser aceitas pelos consumidores (Loretz *et al.*, 2010), sendo empregadas de forma coadjuvante aos programas de controle da qualidade das indústrias frigoríficas (Hugas e Tsigarida, 2008).

Diversos ácidos orgânicos (ácido acético, ascórbico, sórbico, cítrico, fumárico, láctico, tartárico, málico entre outros) estão sendo estudados visando estabelecer um adequado protocolo de sanitização pela determinação do tempo ideal de contato dessas substâncias com as carcaças de animais de açougue, sua forma de aplicação e melhor concentração (Carpenter *et al.*, 2011;

Skrivanová *et al.*, 2011; Mikolajczyk, 2015; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2017). Além de serem substâncias baratas, de fácil utilização e rápida ação, os ácidos orgânicos são tidos como seguros para serem manipulados e ingeridos e a maioria deles não apresenta limitação quanto à ingestão diária aceitável por seres humanos (Mani-López *et al.*, 2012).

**Quadro 1:** Descontaminantes químicos e físicos utilizados em carcaças de animais de açougue.

Descontaminantes Químicos		Descontaminantes Físicos	
Classe	Tipo	Classe	Tipo
Ácidos orgânicos	Ácido láctico, Ácido sórbico, Ácido acético, Ácido tartárico, Ácido fumárico, Ácido málico, Ácido cítrico, Ácido levulínico, Ácido ascórbico	Água	Vapor Água pressurizada Água eletrolisada Água ozonizada
Agentes oxidantes	Peróxido de hidrogênio Ozônio Hidróxido de sódio	Baixas temperaturas	Refrigeração Congelamento
Conservantes orgânicos	Benzoatos Propionatos	Irradiação	-
Bacteriocinas	Nisina	Ultrassom	-
Fosfatos inorgânicos	Fosfato trissódico Pirofosfato de sódio Fosfato monossódico Hexametáfosfato de sódio Tripolifosfato de sódio	Luz UV	-
Compostos clorados	Hipoclorito Dióxido de cloro Hipoclorito Hipoclorito de sódio Clorito de sódio acidificado Clorito de cetilpiridino Monocloramina	Campo elétrico pulsado	-

Fonte: Bolder, 1997; Skrivanová *et al.*, 2011; Loretz *et al.*, 2010; Mikolajczyk, 2015

Nos EUA e na União Europeia (UE) a descontaminação de carcaças de animais de açougue tem sido largamente utilizada em complementação às boas práticas de produção animal, com o objetivo de reduzir ainda mais a presença de micro-organismos na carne. O uso de ácidos orgânicos em carcaças de frangos nos EUA é regulamentado pelo Departamento de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration – FDA) sendo Geralmente Considerado Seguro (*Generally Recognized as Safe – GRAS*) para ser utilizado em produtos cárneos (FSIS, 2016). A UE, por sua vez, permite o uso de ácido láctico (AL) apenas em carcaças bovinas, segundo o Regulamento UE nº 101 de 2013, sendo proibido qualquer processo de descontaminação química em carcaças de frangos (EC,

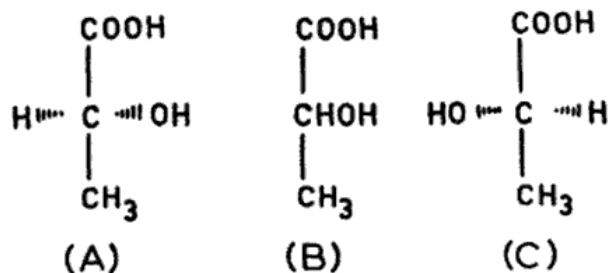
2013). No Brasil, independente da espécie animal abatida, o uso de ácidos orgânicos como descontaminante é proibido, sendo permitido somente o uso de solução hipoclorada na água de renovação do sistema de pré-resfriamento por imersão no abate de aves (Brasil, 1998). Porém, a indústria frigorífica tem demonstrado interesse pela utilização dessa ferramenta auxiliar no controle da qualidade sanitária dos seus produtos, sendo necessária a realização de trabalhos que possam auxiliar as autoridades na discussão desse assunto.

Dentre os ácidos orgânicos, o ácido láctico tem se mostrado uma excelente opção para ser utilizado na descontaminação de carcaças de frango, por ser um composto produzido naturalmente durante a glicólise *post-mortem* em carnes ou alimentos fermentados, não ter cheiro nem sabor desagradável quando diluídos, além de ser barato, de fácil utilização e ser considerado como uma substância segura para ser manipulada e ingerida (Lecompte *et al.*, 2008; Smigic *et al.*, 2010; Chaine *et al.*, 2013; Carpenter *et al.*, 2011; Mani-López *et al.*, 2012).

### 3.3.1. Ácido láctico (AL)

Um dos ácidos orgânicos mais amplamente distribuído na natureza, o AL (ácido 2-hidroxi-propanoico) (Figura 2) foi o primeiro a ser utilizado como aditivo alimentar. Esse composto orgânico apresenta-se como um líquido amarelado a incolor (15°C e 1atm), podendo ser encontrado em uma variada gama de alimentos, no sangue, nos tecidos musculares (como o resultado do metabolismo anaeróbio) ou como subproduto do processo fermentativo de bactérias homofermentadoras (apresentam como único produto da fermentação o ácido láctico) e heterofermentadoras (produzem ácido láctico, dióxido de carbono, álcool etílico e ácido acético) (Maga e Tu, 1994; Mani-López *et al.*, 2012; Komesu *et al.*, 2017).

Há mais de cinco décadas o AL é considerado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) como uma substância segura para ser utilizada em alimentos, não sendo necessário estabelecer o seu limite de ingestão diária e, em consequência, o produto tem sido largamente empregado pelas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de produtos químicos (FAO, 2013). Devido ao sabor ácido suave, quando comparado a outros ácidos utilizados nos alimentos, o AL é empregado como conservante, como agente aromatizante, regulador de pH, potencializador de sabor, agente de cura e inibidor de bactérias em alimentos como doces, pães, cervejas e outros produtos, além de ser um ingrediente essencial em alimentos fermentados de origem animal por: (i) promover a redução do pH, (ii) reduzir o crescimento bacteriano, (iii) transmitir características ácidas ao sabor, (iv) contribuir com a consistência do produto por meio da coagulação proteica e redução da capacidade de retenção de água e (v) por contribuir com o desenvolvimento da cor vermelha característica dos produtos fermentados (Toldrá *et al.*, 2001; Komesu *et al.*, 2017).

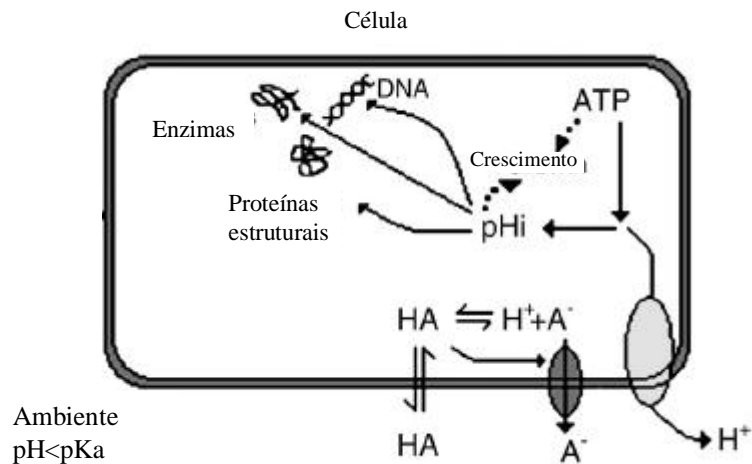


**Figura 2:** Fórmula estrutural do D- (-) Ácido láctico (A), DL – Ácido láctico (B) e L- (+) Ácido láctico (C)

Fonte: Maga e Tu (1994)

No processo de descontaminação de carcaças de animais de açougue, o AL é uma das substâncias mais pesquisadas e utilizadas ao redor do mundo (Mani-López *et al.*, 2012). Segundo o relatório publicado pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (European Food Safety Authority - EFSA), a utilização do AL para a descontaminação de carcaças bovinas proporciona uma considerável redução da contaminação microbiológica em comparação com a ausência de tratamento ou um tratamento com água potável sem, no entanto, contribuir para o desenvolvimento de resistência microbiana (EFSA, 2013). Em 2013, a UE regulamentou a utilização por pulverização de soluções de AL nas concentrações entre 2% e 5% na temperatura máxima de 55°C para a descontaminação de carcaças bovinas inteiras, meias carcaças ou quartos nos estabelecimentos de abate (EC, 2013) não sendo permitido, ainda, o uso de qualquer substância descontaminante no processamento das carnes de aves. Atualmente, em matadouros na Inglaterra, País de Gales e Irlanda do Norte, o ácido láctico e a água potável são as únicas substâncias que podem ser utilizadas para reduzir a contaminação microbiológica na superfície de carcaças bovinas (European Commission, 2013). Os EUA, por sua vez, estabeleceram em 2016, por meio da Diretiva 7120.1, a permissão para a utilização de ácido láctico em soluções de até 5% em carcaças de frango (FSIS, 2016).

Apesar do mecanismo de ação dos ácidos orgânicos não ser completamente elucidado, acredita-se que o AL atue nas células bacterianas a partir da entrada da sua forma não dissociada pela membrana celular, com a dissociação de íons H<sup>+</sup>, levando a redução do pH citoplasmático (Figura 3). A redução do pH do citoplasma celular provoca alterações na cadeia transportadora de elétrons, impedindo a produção de energia, além de causar desnaturação proteica inibindo a ação das enzimas e a síntese de DNA/RNA, promovendo um efeito bactericida imediato e um efeito bacteriostático por tempo prolongado (Snijders *et al.*, 1985; Yang *et al.*, 1998; Mani-López *et al.*, 2012). Este efeito antibacteriano pode ser influenciado por vários fatores como concentração do agente, temperatura, tempo de exposição e teor de lipídeo, sendo que o AL apresenta melhores resultados quando utilizado em tecidos com menor teor de gordura (Mykytczu *et al.*, 2007; Alonso-Hernando *et al.*, 2012).



**Figura 3:** Mecanismo de ação de ácidos orgânicos em células microbianas

Adaptado de Mani-López *et al.*, 2012.

\*A forma não dissociada do ácido orgânico (HA) é difundida através da membrana microbiana quando o pH do citoplasma celular é maior do que o ambiente externo. Para manter o pH interno, é necessário o transporte ativo de prótons (H<sup>+</sup>). O pH ácido no interior da célula danifica ou modifica a atividade enzimática, a estrutura das proteínas e o DNA.

Zeitoun e Debevere (1992), com o objetivo de avaliar a ação descontaminante da aspersão de 20 mL de AL, tamponado com hidróxido de sódio, nas concentrações 5%, 7,5% e 10%, em coxas de frango armazenadas a 6°C por zero, três, seis, nove, 11 e 12 dias, realizaram análises microbiológicas para contagem de psicrotróficos, bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio e *Enterobacteriaceae*, e observaram que houve um maior efeito antimicrobiano com o aumento das concentrações do ácido, sendo que as concentrações 7,5% e 10% resultaram em um prolongamento da vida de prateleira de 5 e 6 dias, respectivamente. Após 12 dias de armazenamento, a contagem de micro-organismos psicrotróficos no grupo tratado com AL 10% atingiu níveis críticos de deterioração (10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup>), no entanto, apesar das altas contagens, a qualidade sensorial observada foi melhor do que a encontrada nas amostras do grupo controle armazenadas por seis dias que tiveram contagens idênticas para estes micro-organismos. Esses resultados foram justificados pelos pesquisadores devido a uma maior inibição de bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio e conseqüente redução na produção de compostos de enxofre, melhorando a qualidade organoléptica das coxas de frango tratadas. Os autores também compararam o efeito do tratamento por imersão durante 15 segundos em AL 2% não tamponado com o tratamento por aspersão de 20 mL de AL 10% tamponado nas características microbiológicas e no pH de coxas de frango armazenadas nas mesmas condições do experimento anterior, sendo observado um efeito descontaminante com um aumento da vida de prateleira, bem como uma redução do pH mais pronunciada seguido de uma elevação mais retardada, nas coxas de frango tratadas com AL tamponado do que com o ácido não tamponado, ainda que a solução de AL não tamponado apresente um menor pH.

Após a imersão da pele de frango, inoculadas com cinco estirpes de *Salmonella* spp. e cinco cepas de *L. monocytogenes*, durante 30 minutos em água estéril e AL 1%, Hwang e Beuchat (1994) observaram reduções entre os tratamentos para os dois patógenos inoculados e, também, quanto à contagem de micro-organismos psicrotróficos. Os pesquisadores avaliaram, ainda,

peles inoculadas com *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* ou *S. aureus*, imersas por 30 minutos em 70 mL de água esterilizada, AL 0,3% adicionado de benzoato de sódio 0,05% (LB35) ou AL 0,5% adicionado de benzoato de sódio 0,05% (LB55) e armazenadas a 4 °C por até 16 dias. As soluções de LB35 ou LB55 reduziram as populações de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *C. jejuni*, em comparação com o grupo controle, não sendo observado células viáveis de *Salmonella* spp. nos tratamentos com LB35 ou LB55 e armazenados a 4 °C durante dois e oito dias, respectivamente. *L. monocytogenes* e *C. jejuni* não foram detectados nos grupos tratados após seis e dois dias de armazenamento a 4 °C respectivamente, enquanto *S. aureus* diminuiu continuamente para um nível não detectável após quatro (LB55) e seis dias (LB35) de armazenamento.

Sinhamahapatra *et al.* (2004) compararam o efeito descontaminante, por imersão e aspersão, de água a 70°C por um minuto, ácido láctico 2% por 30 segundos, cloreto de sódio 1200 ppm por cinco segundos e solução de cloro 50 ppm por cinco minutos, em relação a contagem total em placas e contagem de coliformes totais na superfície de carcaças de frango, imediatamente após os tratamentos e após 24h e 48h de armazenamento sob refrigeração. Os pesquisadores observaram reduções nas contagens realizadas a 0h e após 24h de armazenamento em todos os tratamentos. A imersão em AL e a imersão em água quente apresentaram os melhores resultados na contagem padrão em placas com reduções de  $2,3 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $2,1 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente, enquanto que na contagem de coliformes, os métodos de imersão em cloreto de sódio e imersão em água quente foram os que promoveram as maiores reduções com  $2,4 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $2,2 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. No entanto, após 48h de armazenamento, a carga microbiológica observada na contagem total em placas e na contagem de coliformes aumentou em todos os grupos tratados, bem como no grupo controle. Segundo os autores, o crescimento bacteriano diminui à medida que os micro-organismos prolongam a fase de latência do seu crescimento para se adaptarem ao ambiente alterado, no entanto, após esse período, o crescimento retorna ao seu padrão normal.

O efeito bactericida *in vitro* da solução de AL 1,5% contra diferentes estirpes de *Salmonella* spp. (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Indiana*), foi avaliado por Kanellos e Burriel (2005) ao realizar diluições em série (1:1 a 1:5) e diferentes tempos de contato (5, 10, 30, 60 e 120 minutos) e observaram que com o aumento das diluições houve, também, um aumento no tempo necessário para o completo efeito bactericida. As diluições 1:1 e 1:2 foram bactericidas em cinco minutos para todas as estirpes, enquanto as diluições de AL 1:3 e 1:4 só foram eficientes após 30 minutos de contato. Dentre as estirpes analisadas, *S. Enteritidis* foi a que apresentou maior resistência às soluções de AL.

O efeito descontaminante do AL 1% aplicado por imersão (15s) ou aspersão (1L ou 2L), foi analisado por Okolocha e Ellerbroek (2005) frente a micro-organismos mesófilos aeróbios, enterobactérias, *Salmonella* spp. e *Pseudomonas* spp., em carcaças de frango armazenadas a 4°C por zero, três e seis dias. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, porém houve diferença entre os grupos tratados e o controle para as contagens de mesófilos, enterobactérias e *Pseudomonas* spp. O tratamento por imersão foi o que apresentou os melhores resultados no sexto dia de armazenamento em todos os tratamentos, promovendo uma maior redução na contagem microbiológica. Em relação à frequência de isolamento de *Salmonella* spp. praticamente não houve reduções em nenhum dos grupos tratados, tendo sido observado uma incidência de aproximadamente 60,0% de carcaças positivas para este micro-organismo no dia zero.



O efeito isolado ou em associação da imersão por 2 minutos em AL (1%, 1,5%, e 2%) e da radiação gama (1,5, 2,5, e 3,5 KGy) na eliminação de *Pseudomonas* spp. inoculadas em filés de peito de frango armazenados por cinco dias a 4°C, foi analisado por Antunez *et al.* (2006). Apesar de não ter eliminado totalmente os micro-organismos, todos os tratamentos com AL reduziram as contagens iniciais em, aproximadamente, 1 ciclo logarítmico. A associação do AL e radiação gama de 2,5 KGy foi suficiente para eliminar a carga microbiológica, porém, o uso isolado da radiação provocou alterações sensoriais na superfície do filé de peito de frango. Os resultados demonstraram a possibilidade da associação destas duas técnicas, permitindo o uso de uma dose inferior de radiação que não produza alterações sensoriais perceptíveis, mas que promova a completa eliminação dessas bactérias.

A imersão de peitos de frango, inoculados com  $10^7$  -  $10^8$  UFC g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *S. Enteritidis*, em AL (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%) por 10, 20 ou 30 minutos e armazenados por 14 dias sob refrigeração, foi avaliada por Anang *et al.* (2007), que observaram *E. coli* O157:H7 como a espécie mais sensível e *S. Enteritidis* a mais resistente ao tratamento com ácido. Somente nos tratamentos com AL 1,5% e 2,0% por 20 e 30 minutos promoveram reduções nas contagens dos três micro-organismos avaliados ao final do armazenamento, entretanto, nenhuma das concentrações de ácido ou tempos de tratamento utilizados foram eficazes na eliminação dos agentes patogênicos.

Lecompte *et al.* (2008) avaliaram a eficácia da aplicação de vapor (70°C por 15 ou 60 segundos ou 98°C por 10 ou 60 segundos), da imersão em solução de AL (5% por um minuto ou 10% por um ou 30 minutos), ou da combinação desses tratamentos na inativação de *L. innocua* inoculada na pele de coxas de frango e observaram que somente a utilização do tratamento térmico não foi suficiente para limitar o crescimento desses patógenos após sete dias de armazenamento a 4°C, com um crescimento bacteriano superior no grupo tratado com vapor 98°C por 10 segundos daquele observado no grupo controle. No entanto, a aplicação do AL 10% de forma isolada ou associada ao tratamento térmico, apresentou as menores contagens desse micro-organismo, com reduções superiores a  $1,3 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup> após o armazenamento, sem afetar as características sensoriais do produto (cor e aroma).

A ação descontaminante do AL (2 e 10%), aplicado por imersão durante um ou 30 minutos, sob *L. innocua* inoculada em pele de peito de frango armazenada sob refrigeração por sete dias, também foi avaliada por Lecompte *et al.* (2009) sendo observado que, no dia zero, todos os tratamentos, com exceção do mais fraco (AL 2% por 1 minuto), apresentaram reduções nas contagens desse micro-organismo e que, após sete dias de armazenamento, apenas o tratamento com AL 10% apresentou reduções ( $>3,8 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup>) sem, no entanto, ser observado alterações sensoriais em nenhum dos grupos tratados. Os pesquisadores analisaram ainda, pele de coxas de frango inoculadas com um *pool* de bactérias (*L. innocua*, *S. Enteritidis* e *C. jejuni*) e imersas em AL 5% por 1 minuto e observaram, ao final de sete dias de armazenamento sob refrigeração, reduções apenas na contagem de *L. innocua* ( $1,0 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>) e *S. Enteritidis* ( $6,0 \times 10^2$  UFC/cm<sup>2</sup>).

Anang *et al.* (2010) observaram reduções na contagem bacteriana (mesófilos aeróbios, *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae*) presente em peitos de frango após a imersão em soluções de AL (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%), por 10, 20 e 30 minutos, sendo observado maiores reduções dos micro-organismos pesquisados nos peitos tratados por 20 e 30 minutos nas concentrações de 1,5% e 2,0%. Os pesquisadores realizaram, também, a identificação de 50 isolados de mesófilos aeróbios, das amostras tratadas com AL, detectando a presença,

principalmente, de *Pseudomonas* spp. (40,0%), *E. coli* (16,0%), *Flavobacterium* spp. (10,0%) e *Aeromonas* spp. (8,0%).

A aspersão de 100 g/Kg de solução de AL 4%, tamponado com lactato de sódio, foi avaliada por Burfoot e Mulvey (2011) quanto ao seu efeito bactericida e bacteriostático, em bactérias mesófilas aeróbias, em carcaças de frango de corte armazenadas a 4°C por 16 dias. Segundo os autores houve reduções na contagem média entre o grupo tratado e controle nos dias zero, três, seis e nove. A maior diferença observada foi de  $1,3 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> no dia seis, no entanto, nos dias 13 e 16 não houve diferença entre os tratamentos.

Carpenter *et al.* (2011) avaliaram a ação descontaminante de AL, AA e levulínico (ALv) a 2%, aspergidos em amostras de peles de frango inoculadas com *Salmonella* spp. e armazenadas a 8°C (simulando abuso de temperatura) durante 8 semanas e observaram que apenas o AL apresentou reduções na contagem desses micro-organismos superiores às amostras aspergidas com água (controle). Os pesquisadores avaliaram, também, o efeito residual destes ácidos pulverizando amostras ainda não inoculadas, com os mesmos descontaminantes e, após 20 min, inoculando-as com um *pool* de bactérias (*L. monocytogenes*, *E. coli* e *Salmonella* spp.). Somente o AA apresentou atividade residual para evitar o crescimento bacteriano. Conforme relatado pelos pesquisadores, as reduções microbiológicas observadas após os tratamentos podem ser resultantes da descontaminação imediata das superfícies em consequência do deslocamento físico durante a aplicação das soluções e, também, devido aos efeitos inibitórios residuais que inicialmente podem ser bactericida, por um tempo reduzido como resultado da redução do pH na superfície tratada e bacteriostático em longo prazo.

Cosansu e Ayhan (2012) avaliaram o efeito descontaminante em coxas e peitos de frango inoculados com *S. Enteritidis*, imersos em soluções de AL 1% e 3% por 10 minutos e armazenados a 4°C por 10 dias ou a -18°C por seis meses e observaram reduções iniciais na contagem deste micro-organismo em ambas as concentrações de ácido nas amostras de coxa e peito, e apenas nas amostras de coxas e peito de frango tratados com AL 3% ao final do armazenamento. Em relação às amostras congeladas, não foram observadas diferenças entre o primeiro e o sexto mês de armazenamento nos grupos tratados.

Os tratamentos por imersão em surfactante dodecilsulfato de sódio (DSS) nas concentrações 0,5% e 1% e AL 1% ou 2% foram comparados por Zaki *et al.* (2015) quanto à ação bactericida isolada de cada substância ou em diferentes associações (ácido orgânico e surfactante) frente a *S. enterica* inoculada na pele de peitos de frango e, também, quanto aos efeitos dessas associações na qualidade sensorial de coxas de frango cruas e cozidas, analisadas imediatamente após o tratamento ou a cada dois dias durante o armazenamento refrigerado, até que sinais de deterioração se tornassem evidentes. O AL nas combinações 1% AL / 3 minutos e 2% AL / 3 minutos, promoveram reduções, respectivamente, de  $2,3 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> e  $1,0 \times 10^5$  UFC/cm<sup>2</sup>. As peles tratadas apenas com DSS 0,5% e 1% não apresentaram reduções. Os valores das taxas de redução obtidos devido ao tratamento com combinações de ácidos orgânicos com DSS foram significativamente superiores aos obtidos pela soma de ácido orgânico isolado mais DSS sozinho, indicando que houve efeito sinérgico entre ambos e a combinação de AL com DSS na proporção de 2:1 promoveu a maior taxa de redução microbiológica. Em relação à análise sensorial, não houve diferença significativa entre as amostras cruas e cozidas do grupo tratado e controle no dia 0, a não ser quanto a um ligeiro odor ácido em amostras cozidas do tratamento com 2% AL + 1% DSS, sendo o escore de sabor deste grupo inferior ao grupo controle. A partir do terceiro dia de armazenamento os

escores sensoriais de todas as amostras cruas e cozidas tratadas foram significativamente superiores ao grupo controle. As amostras do grupo controle apresentaram sinais de deterioração a partir do quinto dia e as do grupo tratado somente no sétimo dia de armazenamento, indicando que o tratamento de coxas de frango com combinação de AL e DSS foi eficaz no aumento da vida útil desses produtos.

O efeito do AL e Ácido Cítrico (AC), combinados em diferentes concentrações (0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%) e tempos de pulverização (15, 30, 45 e 60 segundos), na redução da carga microbiológica (*S. aureus*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., coliformes e *Pseudomonas* spp.) e nas características sensoriais de coxas de frango foram avaliados por Zhu *et al.* (2016). Entre as várias combinações analisadas, a que apresentou melhores resultados foi o AL 1,5% associado ao AC 1,5%, aspergidos por 60 segundos, no entanto, este tratamento acarretou em alterações físico-químicas e sensoriais significativas nas coxas de frango. Dessa forma, o melhor tratamento, considerando os aspectos microbiológicos e sensoriais das coxas de frango, foi o AL 0,5% com AC 1%, pulverizados por 30 segundos, tendo proporcionado reduções de  $4,8 \times 10$  UFC/cm<sup>2</sup> na contagem padrão em placas e reduções de 46,67% (controle) para 14,17% (tratado) na incidência de *S. aureus* e de 14,15% (controle) para 3,33% (tratado) na incidência de *Salmonella* spp.

Com o objetivo de avaliar a redução microbiológica promovida pelo uso do AL em diferentes combinações de concentração, temperatura e tempo de aplicação (água, 30°C, 90s [controle]; AL 1%, 30°C e 45s; AL2%, 35°C e 90s; AL 3%, 40°C e 30s; AL 0,5%, 45°C e 75s; AL 1,5%, 50°C e 15s; AL 2,5%, 55°C e 60s) após sua pulverização em carcaças de frango, Liu *et al.* (2016) observaram que, apesar da redução na contagem de micro-organismos mesófilos nos grupos tratados ( $7,2 \times 10$  UFC g<sup>-1</sup> a  $1,1 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup>) em relação ao controle promovida pelo AL, não houve diferença entre os tratamentos realizados com esse ácido orgânico. Dessa forma, AL 1,5% a 50°C por 15s foi considerado como o tratamento mais indicado para ser empregado pela indústria frigorífica, por apresentar reduções com uma menor concentração de descontaminante. Os pesquisadores analisaram, ainda, as mudanças na diversidade bacteriana a partir da identificação microbiológica pela técnica de PCR de amostras coletadas com *swab* estéril em toda a superfície das carcaças em cada passo do processo de abate (depena, evisceração, lavagem, pré-resfriamento e cortes) e após o congelamento rápido, nos grupos controle e tratados. O perfil microbiológico diferiu entre as etapas, com uma maior contaminação durante o processo de lavagem de carcaça e uma redução no número de espécies e quantidade de bactérias após a aspersão do AL. *Lactobacillus* sp. foi identificado na superfície das carcaças em todas as etapas. Representantes da família *Enterobacteriaceae* também foram encontrados em todas as etapas, porém, com uma redução na incidência desses micro-organismos após os tratamentos, indicando a eficácia da descontaminação. *Pseudomonas* sp., desapareceram ao final do processo de abate, mas reapareceram após o congelamento rápido, indicando uma possível contaminação cruzada no ambiente de armazenamento.

Duan *et al.* (2017) compararam o efeito da pulverização de AL 2%, água oxidante eletrolisada ácida (AOEA) 58 ppm e água oxidante eletrolisada ligeiramente ácida (AOELA) 30 ppm sobre o prazo de validade de carcaças resfriadas de frango coletadas em um abatedouro comercial na China. As carcaças foram coletadas logo após o *chiller*, sendo imediatamente tratadas com o auxílio de um equipamento de pulverização com dez saídas, de forma a cobrir toda a superfície da carcaça com fluxo médio de 800 mL por minuto durante 15s e, posteriormente, foram acondicionadas em sacos estéreis e armazenadas a 4°C durante oito dias. Nos dias zero, dois, quatro, seis e oito de armazenamento foram coletadas amostras do peito análises de contagem

viáveis totais - CVT e coliformes 35°C - NMP. Antes das análises, as amostras de pele foram colocadas em tampão fosfato-salino estéril para remoção do desinfetante residual. Os valores de CVT das carcaças tratadas com AL, AOEA e AOELA aumentaram de  $9,4 \times 10^3$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $7,4 \times 10^6$  UFC/cm<sup>2</sup>, de  $1,4 \times 10^4$  para  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> e de  $1,2 \times 10^4$  para  $1,7 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente entre os dias zero e oitavo; no entanto, os valores de CVT das amostras tratadas foram menores do que as amostras não tratadas, que aumentaram de  $6,0 \times 10^4$  UFC/cm<sup>2</sup> para  $9,5 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> durante os oito dias de armazenamento. Em relação às contagens de coliformes 35°C, foram encontradas contagens entre 3,07 a 5,14 NMP/cm<sup>2</sup> nas amostras do grupo controle, e valores inferiores nas amostras tratadas com AOEA (2,31 a 4,21 NMP/cm<sup>2</sup>), AOELA (2,59 a 4,26 NMP/cm<sup>2</sup>) e AL 2% (2,56 a 4,18 NMP/cm<sup>2</sup>), sendo que o tratamento com 2% de AL apresentou as menores contagens ao final dos oito dias de armazenamento. Segundo os autores, os efeitos da deterioração em carnes de frango se tornam evidentes quando a contagem de micro-organismos viáveis é superior a  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> e, dessa forma, o tratamento com AL na concentração de 2% foi eficiente em prolongar a vida de prateleira da carne de frango, uma vez que os valores encontrados para estes micro-organismos foram inferiores ao valor máximo aceitável até o oitavo dia de armazenamento, o que não foi observado nos demais grupos. Os pesquisadores concluíram que estudos adicionais devem ser realizados com o objetivo de aperfeiçoar as condições do sistema de pulverização, como a taxa de fluxo, pressão e tempo de contato para maximizar os efeitos descontaminantes e, ao mesmo tempo, reduzir o desperdício na indústria de frango.

A utilização de substâncias químicas antimicrobianas em carcaças de frango durante o processo de abate pode acarretar em resultados falso-negativos em consequência da ação bactericida contínua desses produtos em amostras coletadas para a detecção e enumeração de bactérias como, por exemplo, do gênero *Salmonella*. Devido a esse risco potencial, Gamble *et al.* (2017) examinaram a capacidade da lecitina de soja altamente refinada, tiossulfato de sódio ou bicarbonato de sódio, incorporados à água peptonada tamponada (meio de enriquecimento utilizado nas análises microbiológicas dessa bactéria), neutralizarem a atividade antibacteriana residual dos produtos químicos antimicrobianos cloreto de cetilpiridínio, ácido peracético, clorito de sódio acidificado e uma mistura de ácido cítrico e clorídrico, rotineiramente empregados pelas indústrias frigoríficas dos EUA. Estas soluções foram inoculadas com uma cultura mista de cinco sorovares de *Salmonella* e os resultados indicaram que os três agentes neutralizaram de forma eficiente os efeitos das quatro soluções antimicrobianas testadas, permitindo a recuperação de *Salmonella* spp. viável equivalente à recuperada das carcaças do grupo controle. Sendo assim, a incorporação dessas substâncias neutralizantes à água peptonada tamponada pode reduzir os resultados falso-negativos e auxiliar em diagnósticos precisos da contaminação microbiológica das carcaças de frango. Entretanto, não foram encontrados artigos na literatura relatando a possível interferência do AL nas metodologias de isolamento e contagens de bactérias, sendo necessário pesquisas sobre esse assunto.

### 3.4. Análise proteômica

A identificação de micro-organismos em laboratório é realizada, principalmente, pelo emprego de testes bioquímicos e pela observação das características fenotípicas celulares. Essas técnicas, apesar de mais simples e baratas, envolvem uma série de etapas, meios de cultura e reagentes, demandando um tempo maior para obtenção dos resultados finais, sendo trabalhosas e demoradas. Ademais, os resultados de testes bioquímicos, utilizados para identificação e biotipagem bacteriana, podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, o que acarreta em um baixo poder discriminatório nos micro-organismos com

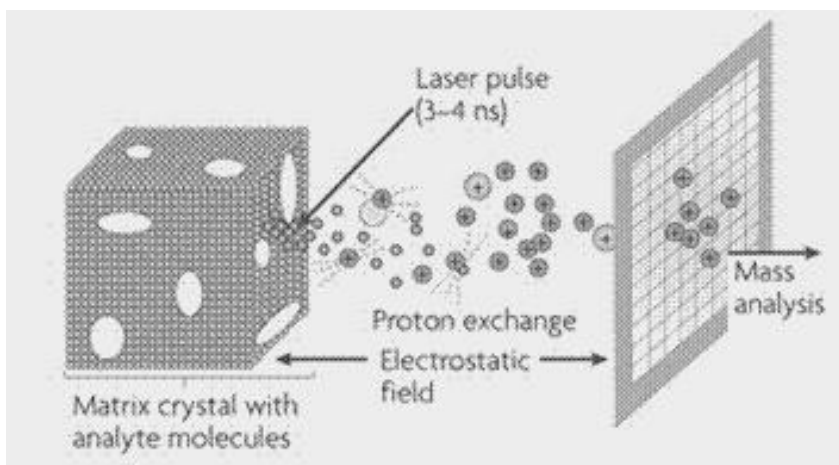
pouca variabilidade genética, culminando em risco de interpretações errôneas quando se utiliza um número limitado de testes (Handelsman, 2004; Gandra *et al.*, 2008; Croxatto *et al.*, 2012). Nesse sentido, a análise proteômica surgiu como uma abordagem inovadora, tendo como objetivo promover a caracterização completa de proteínas (proteoma) específicas em uma escala genômica de uma célula ou organismo (Phillips e Bogyo, 2005; Picariello *et al.*, 2012) e a EM MALDI – TOF tem sido reportado como um método preciso, simples, rápido e econômico para a identificação e caracterização microbiológica, incluindo bactérias, leveduras e fungos, e com aplicações potenciais em diversas áreas, incluindo o controle de qualidade de alimentos (Croxatto *et al.*, 2012; Nomura, 2015).

### **3.4.1. Espectrometria de Massas por Dessorção e Ionização a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (EM MALDI – TOF) na identificação de micro-organismos**

Desde o seu surgimento, EM MALDI – TOF tem sido aplicada de forma revolucionária devido à sua capacidade de analisar misturas complexas e moléculas de massas elevadas com sensibilidade, exatidão e precisão, requerendo reduzidas quantidades de amostras e ionizando grandes biomoléculas de forma suave, promovendo sua vaporização sem, no entanto, causar a sua destruição (Harris, 2005; Sogawa *et al.*, 2011; Pavlovic *et al.*, 2013). Essas características tornaram esta técnica o método de espectrometria de massas mais utilizado para a identificação microbiológica (Böhme *et al.*, 2016). A técnica consiste no estudo da matéria através da formação de íons em fase gasosa, os quais são posteriormente separados (analisados) por um analisador de massas de acordo com a sua razão massa/carga e o processo de identificação se baseia no fato de que impressões digitais espectrais variam entre micro-organismos e alguns picos detectados nos espectros são específicos do gênero, espécie e das subespécies (IUPAC, 1997; Nomura, 2015).

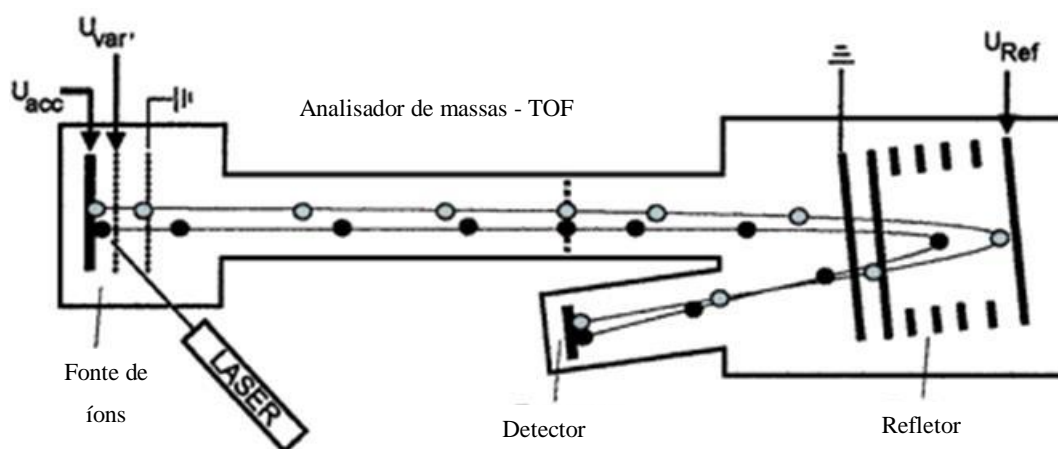
O equipamento é composto, basicamente, por um sistema de introdução de amostras, que transfere a amostra do ambiente para a câmara de ionização; um ionizador, responsável por vaporizar e carregar as moléculas eletricamente; um analisador de massas, que separa os íons resultantes da ionização com base na razão massa/carga; um detector, que conta os íons e transfere o sinal para um computador; e, finalmente, por um sistema de aquisição de dados, que processa os dados e reproduz em forma de gráfico de espectro de massa o número de íons detectados (Cunha *et al.*, 2006b; Cantú *et al.*, 2008).

Para análise, uma pequena porção de uma colônia alvo pré-cultivada é depositada em uma placa de aço inoxidável sendo, em sequência, adicionada de uma matriz composta por ácidos orgânicos. Essa mistura é seca ao ar e a cristalização da matriz promove a co-cristalização do analito a ela associada. Ao ser inserida no espectrômetro de massas, um pulso de laser é incidido sobre a mistura e as moléculas da matriz orgânica absorvem a maior parte da energia, minimizando a degradação ocasionada pela radiação, transferindo para a amostra uma pequena porção, o que propicia a dessorção dos analitos que são vaporizados e ionizados na fase gasosa (Figura 4). Esse processo ocorre sob vácuo e os íons formados são acelerados em direção ao analisador de massas por um campo eletrostático (Paiva *et al.*, 2010; Moraes, 2013; Moore *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Representação esquemática de ionização por fonte de MALDI.  
 Fonte: Sauer e Kliem (2010)

Como dito anteriormente, o analisador de massas é a próxima etapa no processo de análise proteômica desempenhando a função de separar os íons de acordo com sua massa específica e o tempo gasto para percorrer uma distância livre de gravidade. O analisador do tipo TOF tem sido o mais utilizado em associação a fonte do tipo MALDI, devido a sua faixa de detecção de massas ilimitada, alto poder de resolução e alta velocidade de aquisição com intervalo de análise de milissegundos (Figura 5) (Paiva *et al.*, 2010; Sauer e Kliem, 2010; Drigo, 2013).



**Figura 5.** Representação esquemática do Reflectron – analisador tipo TOF com sistema refletor.  
 Adaptado de: <http://cbc.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture23/Lecture23.html>.

Os detectores compreendem a porção final do espectrômetro de massas e tem como função detectar os íons que chegam até ele amplificando o sinal e convertendo-os em sinais elétricos que podem ser armazenados e traduzidos em imagens (Koppelaar *et al.*, 2005). Os gráficos formados são comparados com os diferentes algoritmos armazenados no banco de dados previamente criado, para a identificação e classificação do padrão de massas das proteínas bacterianas. Atualmente dois sistemas com banco de dados são os mais utilizados: o Bruker Biotyper, desenvolvido pela Bruker Daltonics, e o Vitek® bioMérieux, criado pela Shimadzu

Corporation. Embora apresentem princípios operacionais semelhantes, os dois sistemas possuem diferenças na construção do banco de dados e nos algoritmos utilizados no processo de identificação microbiológica (Nomura, 2015).

EM MALDI TOF tem sido relatada por diversos autores como eficiente para identificação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos veiculados por alimentos (Mazzeo *et al.*, 2006; Dieckmann e Malorny, 2011; Han *et al.*, 2014; Singhal *et al.*, 2015; Höll *et al.*, 2016), sendo capaz de identificar proteínas de resposta ao estresse e envolvidas em fatores de virulência (Mujahid *et al.*, 2008) e com potencial para substituir a identificação microbiológica por técnicas moleculares convencionais como a eletroforese em gel de poliacrilamida, técnicas de sequenciamento de genes 16s rRNA, análise molecular baseada em PCR (GTG) 5 e a análise simultânea do gene PheS (Doan *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2014).

A principal limitação da técnica é a necessidade de um banco de dados espectral que contenha impressões das massas peptídicas de referência, específicas quanto ao gênero, espécie ou subespécie, limitando a identificação de novos isolados (Dec *et al.*, 2016; Höll *et al.*, 2016). No processo de identificação do micro-organismo, utiliza-se critérios baseados em pontuações (scores) de confiança que vão de 0,00 a 3,00. Pontuações abaixo de 1,70 não permitem uma identificação confiável do micro-organismo; valores de registro (pontuação) entre 1,70 e 1,99 permitem a identificação ao nível do gênero; entre 2,00 e 2,29 significa identificação altamente provável ao nível do gênero e identificação provável ao nível da espécie; e uma pontuação >2,30 (2,30-3,00) indica identificação altamente provável ao nível da espécie (Dec *et al.*, 2016). Apesar de alguns pesquisadores destacarem a necessidade do uso de colônias frescas para uma melhor identificação (Mazzeo *et al.*; 2006) alguns trabalhos (Carbonnelle *et al.*, 2007) relatam que não há influência das condições de cultivo ou do tempo da cultura na capacidade de identificação microbiana pela técnica. Dušková *et al.* (2012) destacam a necessidade de mais estudos que considerem os diferentes protocolos de preparo das amostras, meios de cultura, parâmetros de medida e identificações de biomarcadores específicos.

Nagase *et al.* (2002) coletaram em fazendas no Japão, com o auxílio de *swabs* estéreis, 81 amostras da pele de galinhas vivas, bem como 90 amostras da pele de estudantes no mesmo país e analisaram, a partir da EM MALDI-TOF, quanto à presença de *Staphylococcus* spp. Das amostras de aves e humanos analisadas, 90,0% e 88,9% foram positivas para o micro-organismo, respectivamente. Foram identificadas as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. lentus* e *S. saprophyticus* nas aves e as espécies *S. aureus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. lugdunensis*, *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. saprophyticus* nos humanos.

Ao avaliarem a aplicabilidade da EM MALDI-TOF para a identificação de 24 espécies bacterianas e para a identificação específica da *Escherichia coli* O157:H7 cedidas por instituições de pesquisa, Mazzeo *et al.* (2006) concluíram que a técnica é altamente eficiente, apresentando uma lista confiável e reprodutível de picos dos perfis moleculares específicos. Foi observado também que a análise de células congeladas ou liofilizadas apresentavam uma qualidade e reprodutibilidade de espectros de massa inferior ao das culturas de caldo fresco e que há um aumento de ruído de fundo e uma redução da intensidade de sinal. Tal fato pode ser devido a um rompimento descontrolado das células bacterianas durante os processos de armazenamento. Outro ponto observado foi que as bactérias Gram-positivo produziram espectros de massa com um menor número de sinais mais fortes ao ser comparada com os espectros produzidos por células de bactérias Gram-negativo.

Devido a diversidade de *S. enterica* subsp. *enterica*, a discriminação dos sorotipo desta espécie pela técnica de MALDI-TOF requer espectros com um elevado número de picos de proteínas reprodutíveis. Com o objetivo de estabelecer algoritmos, a partir da combinação de biomarcadores não-ribossômicos específicos, que auxiliassem na identificação rápida dos sorovares de *S. enterica* mais prevalentes e epidemiologicamente importantes, Dieckmann e Malorny (2011) analisaram 913 cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, com ênfase nos cinco principais sorotipos isolados na Europa – Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Virchow e Hadar, concluindo que esta técnica pode ser usada para rastrear esses sorovares, sendo uma ferramenta valiosa no diagnóstico de rotina microbiológica devido a rapidez, praticidade e baixo custo de análise, e por reduzir o número de amostras que precisam ser confirmadas pela técnica sorológica. No entanto, nenhum marcador foi sorovar específico, sendo necessária a combinação de vários marcadores para a identificação, dificultando a reprodução em outros laboratórios.

Giombelli (2013), comparando EM MALDI-TOF com outras três técnicas de diagnóstico: técnica sorológica clássica, bioquímica automatizada com sistema VITEK<sup>2</sup>™ e sistema de biologia molecular baseado em ribotipagem, quanto a capacidade de identificação de 35 isolados de *Salmonella* spp. de carcaças de frangos, concluiu que a técnica é eficiente na identificação de *Salmonella* spp., porém não foi possível identificar os diferentes sorogrupos da bactéria.

Dallagassa *et al.* (2014) analisaram 180 estirpes de *E. coli* com o objetivo de avaliar a aplicabilidade da técnica EM MALDI-TOF na diferenciação das estirpes comensais e patogênicas de *E. coli*. Os picos m/z encontrados estavam distribuídos na faixa de aproximadamente 3.000 a 15.000 Da, com a maioria apresentando picos até 10.500 Da. Dois picos foram compartilhados entre todas as estirpes de *E. coli* (m/z 5.380 e 7.271 Da) sendo que o primeiro deles também está presente em *Salmonella* spp., sugerindo ser um marcador da família *Enterobacteriaceae*. Um pico (m/z 9.060 Da) foi compartilhado entre todas as *E. coli*, exceto pela estirpe de STEC. Os demais picos foram diferentes quanto à distribuição entre as estirpes, confirmando que é possível diferenciar as categorias dessas bactérias.

Höll *et al.* (2016) analisaram peitos de frango sem pele embalados em atmosfera modificada (alta concentração de oxigênio e baixa concentração de oxigênio) e armazenados a 4°C quanto à composição da microbiota pela técnica de proteômica e observaram no oitavo dia de armazenamento uma predominância das espécies bacterianas *B. thermosphacta*, *Carnobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Lactobacillus* sp., nas embalagens com alta concentração de oxigênio e, *B. thermosphacta*, *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *H. alvei*, *Carnobacterium* sp. e *Lactobacillus* sp. nas amostras armazenadas em embalagens com baixa concentração de oxigênio.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Coleta das Amostras

Para realização deste experimento foram coletadas 90 carcaças de frangos de corte diretamente de um abatedouro frigorífico sob inspeção oficial com capacidade diária de abate de 200 mil aves, localizado no estado de Minas Gerais, entre os meses de agosto e outubro de 2016. As carcaças foram coletadas, de forma aleatória, imediatamente após a saída do *chiller*, ao final da



etapa de gotejamento, sendo imediatamente aspergidas com as soluções determinadas conforme os respectivos tratamentos. A aplicação das soluções foi realizada dentro da sala de processamento, de forma homogênea em toda a superfície das carcaças. Cada carcaça foi aspergida, com o auxílio de borrifadores manuais posicionados a uma distância de 20 cm de sua superfície, com 10 mL de solução em cada face, totalizando 40 mL de solução por carcaça (Zeitoun e Debevere, 1990; Sakhare *et al.*, 1999). As soluções utilizadas encontravam-se a temperatura ambiente ( $18 \pm 1^\circ\text{C}$ ) no momento da aspersão e, logo após, as carcaças foram armazenadas em embalagens individuais corretamente identificadas em relação ao tratamento e encaminhadas sob refrigeração até o Laboratório de Aves e Ovos da EV-UFGM, onde permaneceram armazenadas sob refrigeração à temperatura média de  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ . Após sete dias de armazenamento, as amostras foram transportadas sob refrigeração em caixas isotérmicas até o Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), localizado a, aproximadamente, 25 min da EV-UFGM, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

#### **4.2. Preparo das soluções descontaminantes**

Para preparo das soluções de ácido láctico foi utilizada uma solução de ácido láctico a 85% PA (Docina Nutrição, Juiz de Fora, MG, Brasil). No preparo da solução de ácido láctico a 5% foram pipetadas 29,41 mL da solução padrão para um balão volumétrico e o seu volume foi completado para 500 mL com água potável. De modo similar, no preparo da solução de ácido láctico a 7% foram pipetadas 41,17 mL da solução padrão para um balão volumétrico e o seu volume foi completado para 500 mL com água potável. A cada semana de coleta de amostras foram preparadas soluções novas e estas foram armazenadas, à temperatura ambiente, em frascos âmbar individuais e devidamente identificados. Foi utilizado água potável no preparo das soluções, assim como na aspersão do grupo controle, ao invés de água estéril, para aproximar das efetivas condições de processamento de um ambiente industrial. A solução de ácido láctico utilizada em todo o trabalho foi proveniente de um mesmo lote.

#### **4.3. Tratamentos**

Os tratamentos, definidos de acordo com a concentração do descontaminante utilizado para aspersão das carcaças, foram os seguintes:

- 1- Carcaças aspergidas com água potável (controle);
- 2- Carcaças aspergidas com ácido láctico a 5%;
- 3- Carcaças aspergidas com ácido láctico a 7%.

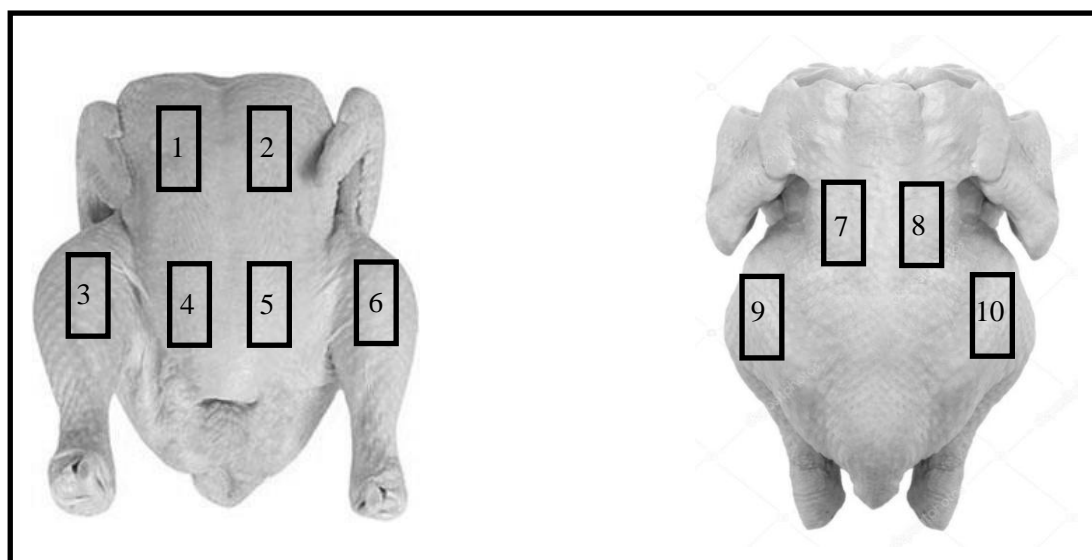
Para realização do experimento foram coletadas 30 carcaças de frangos de corte por tratamento, totalizando 90 carcaças. As coletas foram realizadas em seis diferentes dias de produção sendo realizada a coleta de 15 carcaças por dia (cinco carcaças por tratamento), selecionadas aleatoriamente na linha de processamento logo após a etapa de gotejamento.

#### **4.4. Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas (pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp.; e contagens de Coliformes, micro-organismos Psicotróficos e *Staphylococcus* spp.) foram realizadas no Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos do Instituto Mineiro de Agropecuária e a identificação molecular dos micro-organismos (*Salmonella* spp., *Listeria* spp., Psicotróficos e

*Staphylococcus* spp.) foi executada no Aquacen, Laboratório Oficial Central do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), localizado na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG).

No momento das análises as embalagens externas de cada carcaça foram desinfetadas com solução de álcool iodado a 5% e, em seguida, procedeu-se a abertura das embalagens por meio de tesouras estéreis. De cada carcaça analisada foram retiradas, asséptica e aleatoriamente, porções de pele e músculo de diferentes partes (dorso, peito e coxa), conforme esquematizado na Figura 6, com o auxílio de tesouras e pinças estéreis. As partes retiradas foram homogêneas, sendo subdivididas em alíquotas de 25 g para a contagem de coliformes 35°C e 45°C (UFC g<sup>-1</sup>), *Staphylococcus* spp. (UFC g<sup>-1</sup>) e psicrotróficos (UFC g<sup>-1</sup>); 25 g para pesquisa de *Listeria* spp.; e 25 g para a pesquisa de *Salmonella* spp.



**Figura 6.** Locais de coleta de amostras de pele e músculo das carcaças de frango.

#### 4.4.1. Coliformes a 35°C e 45°C

Para enumeração de bactérias do grupo coliformes utilizou-se o método Petrifilms<sup>TM</sup> EC (3M<sup>TM</sup>, St Paul, Minnesota, USA) de acordo com AOAC (2002). Alíquotas de 25 g de cada *pool* de amostras das carcaças de frango foram pesadas e acondicionadas assepticamente em sacos plásticos estéreis. Em sequência, foram adicionadas 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e as amostras foram homogêneas, com auxílio de um homogeneizador tipo *stomacher*, por 60 segundos.

Diluições decimais foram preparadas a partir da diluição inicial (10<sup>-1</sup>) até a diluição 10<sup>-4</sup> em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%. A partir da diluição 10<sup>-2</sup> foram pipetadas alíquotas de 1,0 mL em Placas Petrifilms<sup>TM</sup> EC e estas foram incubadas em estufa a 35 ± 1°C por 48 h. As contagens foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, em que as colônias que apresentaram coloração rósea com formação de gás foram consideradas como

coliformes 35°C e as colônias que apresentaram coloração arroxeada com formação de gás foram consideradas coliformes 45°C (Curiale *et al.*, 1991).

#### **4.4.2. *Staphylococcus* spp.**

A enumeração de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. foi realizada de acordo com o protocolo ISO (1999). Diluições decimais foram preparadas a partir da diluição inicial ( $10^{-1}$ ) até a diluição  $10^{-4}$  em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%. A partir da diluição  $10^{-2}$  foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL em Placas contendo ágar Baird-Parker (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) enriquecido com emulsão de gema de ovo em solução salina 0,85% (1:1) e solução de telurito de potássio 1%. Após espalhamento da alíquota, com auxílio da alça de *Drigalsky*, as placas foram incubadas invertidas em estufa a  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 h. Foram consideradas colônias típicas de *Staphylococcus* spp. as que se apresentavam negras, brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio e como colônias atípicas as acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos.

#### **4.4.3. *Salmonella* spp.**

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. alíquotas de 25 g de cada *pool* de amostras das carcaças de frango foram pesadas e acondicionadas assepticamente em sacos plásticos estéreis. Para o pré-enriquecimento, 225 mL de solução salina peptonada 1% tamponada (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) foram adicionadas a amostra que foi homogeneizada com auxílio de um homogeneizador tipo *stomacher* por 120 segundos, e incubada em estufa a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $18 \pm 2$  h.

Posteriormente, foi pipetado 0,1 mL da amostra pré - enriquecida em tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis R10 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), que foi incubado em banho-maria a  $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 3$  h. Para realização do isolamento e seleção das bactérias, realizou-se o repique a partir do caldo Rappaport-Vassiliadis em ágar Rambach (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), que foi incubado em estufa a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 3$  h (ISO, 2002).

#### **4.4.4. Micro-organismos psicrotróficos**

A enumeração de micro-organismos psicrotróficos (UFC  $\text{g}^{-1}$ ) foi realizada de acordo com Cousin *et al.* (2001). Diluições decimais foram preparadas a partir da diluição inicial ( $10^{-1}$ ) até a diluição  $10^{-5}$  em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%. A partir da diluição  $10^{-3}$  foram pipetadas alíquotas de 0,1 mL em Placas contendo Ágar Padrão para Contagem (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Após espalhamento da alíquota, com auxílio da alça de *Drigalsky*, as placas foram incubadas invertidas sob refrigeração a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  por 10 dias.

#### **4.4.5. *Listeria monocytogenes***

Para a pesquisa de *Listeria monocytogenes* alíquotas de 25 g de cada *pool* de amostras das carcaças de frango foram pesadas e acondicionadas assepticamente em sacos plásticos estéreis. Em sequência, foram adicionadas 225 mL de solução Difco™ Demi-Fraser (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, França), e as amostras foram homogeneizadas, com auxílio de um homogeneizador tipo *stomacher* por 60 segundos, sendo em seguida incubadas em estufa a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $25 \pm 1$  h. Posteriormente, 0,1 mL dessa solução primária foi transferida para 10

mL de caldo Difco™ Fraser (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, França) e incubado em estufa a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2$  h. Utilizando-se uma alça descartável, esse cultivo foi repicado em Ágar Palcam (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, França) e as placas incubadas invertidas em estufa a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  h (ISO, 1996).

#### 4.5. Identificação proteômica

Para a realização da identificação e caracterização bacteriana das amostras de carcaças de frango, foram selecionadas até cinco colônias morfológicamente distintas das placas de cultura das análises de *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e psicrotróficos, das cinco carcaças analisadas por semana, em cada um dos três tratamentos (controle, AL 5% e AL 7%) para serem analisadas e identificadas pela técnica de Espectrometria de Massas por Dessorção e Ionização a Laser Assistida por Matriz – Tempo de Voo (EM MALDI – TOF) utilizando o equipamento Microflex™ (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) e banco de dados correspondente. A matriz utilizada foi a  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid suitable para EM MALDI-TOF (Sigma-Aldrich®).

#### 4.6. Delineamento

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo três tratamentos (controle, ácido láctico 5% e ácido láctico 7%). Foram coletadas 90 carcaças de frango durante seis semanas, subdivididas em 15 carcaças coletadas por semana, ou seja, cinco carcaças por tratamento. Cada semana de coleta foi considerada uma repetição. Para os resultados de coliformes  $35^\circ\text{C}$  e  $45^\circ\text{C}$ , micro-organismos psicrotróficos e *Staphylococcus* spp. foi realizado análise de variância não paramétrica, com transformação de dados e aplicação do teste de Kruskal-Wallis. Para *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. realizou-se análise descritiva.

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Análise microbiológica

##### 5.1.1. Contagens de Coliformes, *Staphylococcus* spp. e micro-organismos Psicrotróficos

Os resultados médios das contagens de coliformes  $35^\circ\text{C}$  e  $45^\circ\text{C}$ , *Staphylococcus* spp. e micro-organismos psicrotróficos em carcaças de frango de corte, após a aspersão de água e ácido láctico a 5% e 7% e armazenamento a  $4^\circ\text{C}$  por sete dias são apresentados na Tabela 1. Não foram observadas diferenças ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos para nenhuma das variáveis microbiológicas avaliadas.

As contagens observadas no grupo controle em relação à contaminação por coliformes a  $35^\circ\text{C}$  variaram entre  $<1,0 \times 10^1$  UFC  $\text{g}^{-1}$  a  $1,7 \times 10^5$  UFC  $\text{g}^{-1}$ . Esses valores foram semelhantes aos observados nos grupos tratados com AL 5% ( $<1,0 \times 10^1$  UFC  $\text{g}^{-1}$  e  $1,5 \times 10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ) e AL 7% ( $<1,0 \times 10^1$  UFC  $\text{g}^{-1}$  e  $1,5 \times 10^6$  UFC  $\text{g}^{-1}$ ). Na pesquisa de coliformes a  $45^\circ\text{C}$  a contaminação observada no grupo controle variou entre  $<1,0 \times 10^1$  UFC  $\text{g}^{-1}$  e  $3,0 \times 10^3$  UFC  $\text{g}^{-1}$ , enquanto no grupo tratado com AL 5% foi de  $<1,0 \times 10^1$  UFC  $\text{g}^{-1}$  a  $6,6 \times 10^2$  UFC  $\text{g}^{-1}$ , e no grupo com AL 7% de  $<1,0 \times 10^1$  UFC  $\text{g}^{-1}$  a  $2,0 \times 10^3$  UFC  $\text{g}^{-1}$ .

**Tabela 1.** Média das contagens de coliformes 35°C e 45°C, *Staphylococcus* spp. e micro-organismos psicotróficos (UFC g<sup>-1</sup>) em carcaças de frango após aspersão de água (controle) e ácido lático a 5% e 7%.

Parâmetro	Controle	AL 5%	AL 7%
Col. 35°C	1,6x10 <sup>4</sup>	7,7x10 <sup>4</sup>	5,8x10 <sup>4</sup>
Col. 45°C	1,9x10 <sup>2</sup>	4,5x10 <sup>1</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>
<i>Staphylococcus</i> spp.	2,2x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>
Psicotróficos	8,9x10 <sup>6</sup>	7,6x10 <sup>6</sup>	8,8x10 <sup>6</sup>

AL 5%: ácido lático 5%; AL 7%: ácido lático 7%; Col. 35°C: coliformes 35°C; Col. 45°C: coliformes 45°C

Em relação à contaminação por coliformes a 45°C, 54,4% das carcaças foram negativas para estes micro-organismos, correspondendo a 19 carcaças do grupo controle, 17 carcaças do grupo tratado com AL 5% e 13 carcaças do grupo tratado com AL 7%. Apesar da aparente redução no número de carcaças positivas com o aumento da concentração do AL não foram observadas diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Todas as carcaças encontravam-se dentro dos padrões determinados pela legislação brasileira, que estabelece como único padrão microbiológico, em relação à carne de aves *in natura* refrigerada, contagens inferiores a  $5,0 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> de coliformes a 45°C (Brasil, 2001). Esses micro-organismos, quando presentes nos alimentos, podem fornecer informações em relação à ocorrência de contaminação de origem fecal, da provável presença de patógenos e de condições sanitárias ou de temperatura inadequadas durante a produção, armazenamento ou manipulação (Franco e Landgraf, 1996; Penteado e Esmerino, 2011).

As baixas contagens do grupo coliformes a 45°C observadas nas carcaças de frango mesmo após sete dias de armazenamento, podem ser o reflexo da adequada implementação dos programas de boas práticas de fabricação nas granjas produtoras das aves e, também, na indústria processadora, o que exerce uma grande influência na contagem microbiológica na carne produzida. Segundo Guerreiro e Taylor, (1994) e ICMFS (2005) devido à presença disseminada desses micro-organismos na superfície e no trato gastrointestinal dos animais, as etapas de escalda, depena, evisceração, *chiller* e embalagem são pontos críticos de controle durante o processo tecnológico de obtenção e, portanto, as práticas higiênico-sanitárias empregadas nessas etapas determinam a carga de micro-organismos patogênicos e deteriorantes que será adicionada às carcaças dos animais:-

As contagens para *Staphylococcus* spp. observadas no presente trabalho variaram de  $< 1,0 \times 10^1$  UFC g<sup>-1</sup> a  $3,1 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup>,  $< 1,0 \times 10^1$  UFC g<sup>-1</sup> a  $1,5 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> e de  $< 1,0 \times 10^1$  UFC g<sup>-1</sup> a  $1,5 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, nos grupos controle, AL 5% e AL 7%, respectivamente. Do total de amostras analisadas, 81 (90%) foram positivas para *Staphylococcus* spp. sendo que destas, 52 (64,2%) apresentaram baixas contagens para estes micro-organismos, variando entre  $1,0 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> e  $9,0 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>; entretanto, como não foram realizadas provas de coagulase, não foi possível determinar a incidência de SCP e SCN. A presença disseminada dessas bactérias na natureza, no ambiente industrial, no ser humano e nos animais, associado a sua capacidade de crescimento em uma ampla faixa de pH e temperatura, favorecem a contaminação e o crescimento destes micro-organismos nos produtos alimentícios, em especial naqueles que requerem maior manipulação durante o processamento tecnológico (Le Loir *et al.*, 2003). Ainda que a legislação brasileira não estabeleça padrões microbiológicos em relação à contagem de micro-organismos

*Staphylococcus* spp. (Brasil, 2001), a sua presença representa um risco para os consumidores devido a capacidade dessas bactérias produzirem enterotoxinas em uma ampla faixa de pH e temperatura, substâncias que apresentam grande resistência aos tratamentos térmicos, congelamento, às enzimas proteolíticas e ao baixo pH.

Martins *et al.* (2013) observaram valores diferentes aos encontrados neste trabalho ao analisarem carcaças refrigeradas de frango, com contagens médias de  $5,3 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup>. Menezes (2013) observou que 69,0% das amostras de carcaças de frango analisadas apresentaram contagens superiores a  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup>, assim como Cintra *et al.* (2016), que ao analisarem amostras coletadas após a etapa de pré-resfriamento, observaram contagens médias de *Staphylococcus* spp. variando entre  $<1,0 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup> e  $3,0 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup>.

Todas as carcaças foram positivas para bactérias do grupo dos psicotróficos, mas apenas 27 (30%) apresentaram contagens superiores a  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup> após o armazenamento por sete dias, valor em que sinais de deterioração começam a ser observados (Adamcic e Clark, 1970; ICMSF, 2005). Em relação à contaminação por este grupo de bactérias, as contagens máximas e mínimas foram semelhantes entre todos os tratamentos, variando de  $7,6 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> a  $>2,6 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup>, no grupo controle, de  $1,0 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> a  $>2,6 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup>, no grupo com AL 5% e, no grupo tratado com AL 7%, entre  $7,2 \times 10^3$  UFC g<sup>-1</sup> e  $>2,6 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup>. Apesar da legislação brasileira não estabelecer parâmetros para a contagem de micro-organismos psicotróficos nas carcaças de frango, a qualidade sanitária e a vida útil das carnes frigorificadas são significativamente afetadas pela extensão da contaminação por estas bactérias. A generalidade dos agentes responsáveis pelas DTAs e pelo processo de deterioração microbiológica da carne de frango, como *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Listeria* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Carnobacterium* spp., *Brochothrix* spp., *Alcaligenes* spp., *Serratia* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., e *Yersinia* spp., apresentam crescimento em temperatura de refrigeração, representando um grande problema para a indústria e para os consumidores (Russell, 2001; Rouger *et al.*, 2017). Essas bactérias deterioradoras são responsáveis por uma perda anual de US\$300 a US\$600 milhões na carne de frango produzida nos Estados Unidos, devido a alterações organolépticas do produto (Russell, 2001). Sendo assim, do mesmo modo que a contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas pode ser utilizada para avaliação da qualidade higiênica e sanitária dos produtos, a contagem de micro-organismos psicotróficos pode indicar se houve falhas durante a manipulação ou armazenamento dessas carnes.

Hinton Jr. *et al.* (2004) observaram contagens superiores àquelas encontradas no presente estudo ao avaliarem carcaças de frango armazenadas por sete ( $1,2 \times 10^8$  -  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>) e por 14 dias ( $1,1 \times 10^9$  -  $1,6 \times 10^{12}$  UFC mL<sup>-1</sup>) a 4°C. Resultados inferiores aos destes pesquisadores foram observados por Mellor *et al.* (2011) que encontraram contagens médias de  $2,6 \times 10^7$  UFC g<sup>-1</sup> para *Pseudomonas* spp. em pele de coxas de frango armazenadas aerobicamente sob refrigeração por sete dias.

Ao contrário do observado por diversos autores que indicaram a melhoria da qualidade microbiológica em produtos oriundos do abate de frangos (carcaças e cortes) após a utilização de soluções de AL, pela redução da microbiota, seja ela deterioradora ou patogênica, neste trabalho não houve reduções na contaminação microbiológica das carcaças a partir da ação descontaminante do AL. Entretanto, os trabalhos relatados na literatura científica, em sua grande maioria, foram realizados a partir da inoculação microbiológica (Nakai e Siebert, 2004;

Carpenter *et al.*, 2011), em porções específicas da carcaça como peito (Antune *et al.*, 2006; Anang *et al.*, 2007; Lecompte *et al.*, 2009; Cosansu e Ayhan, 2012; Zaki *et al.*, 2015) e coxas (Lecompte *et al.*, 2008; Lecompte *et al.*, 2009; Cosansu e Ayhan, 2012; Zhu *et al.*, 2016) ou em associação a outros tratamentos como vapor (Lecompte *et al.*, 2008), água quente (Liu *et al.*, 2016), surfactante (Zaki *et al.*, 2015), tamponante (Hwang e Beuchat, 1994; Burfoot e Mulvey, 2011), radiação (Antunez *et al.*, 2006), entre outros. Além disso, é importante considerar, também, as diferentes formas de aplicação empregadas, podendo ser por aspersão ou imersão (Okolocha e Ellerbroek, 2005; Zaki *et al.*, 2015), feita manualmente ou com auxílio de equipamento (Lecompte *et al.*, 2009), bem como a pressão utilizada (Duan *et al.*, 2017), o tempo de contato e o volume aplicado por carcaça (Sakhare *et al.*, 1999; Okolocha e Ellerbroek, 2005). Estas diferenças entre os procedimentos podem influenciar diretamente no efeito antibacteriano desse sanitizante (Bolder, 1997; Smulders e Greer, 1998).

Segundo Okolocha e Ellerbroek (2005) a aplicação das soluções descontaminantes por imersão ou o uso de porções e não carcaças inteiras permite ao descontaminante permear de maneira mais eficaz a superfície tratada, facilitando o seu contato com os micro-organismos. Da mesma forma, a pressão empregada no processo de aspersão pode facilitar a penetração do sanitizante nos canais e pregas da pele das aves, local de proteção e aprisionamento das bactérias, bem como promover um arraste daqueles micro-organismos fracamente aderidos. Tais efeitos também podem ser favorecidos pela utilização de um maior volume de sanitizante, proporcionando uma melhor cobertura e uniformidade na distribuição do ácido orgânico, como empregado por Okolocha e Ellerbroek (2005), que aplicaram 1L a 2L de AL com o auxílio de uma bomba elétrica, ou por Duan *et al.* (2017), que aplicaram 200 mL de AL com o auxílio de aspersor automático, e observaram reduções microbiológicas nas carcaças de frango. Dessa forma, a ausência de reduções na presença ou nas contagens dos micro-organismos observada durante o experimento e, portanto, ausência de diferença entre os tratamentos, pode ser atribuída ao pequeno volume de AL aspergido em relação ao tamanho das carcaças de frango e/ou à baixa pressão utilizada no sistema de pulverização manual. Todavia, ainda que o uso de altos volumes de descontaminantes sejam mais eficientes na redução da carga microbiológica, essa possibilidade deve ser bem avaliada, pois sua utilização pode não ser técnica e/ou economicamente viável em plantas comerciais, principalmente naquelas com grande capacidade de abate.

Sakhare *et al.* (1999) observaram diferenças na contagem de micro-organismos mesófilos, *Staphylococcus* spp. e coliformes ao aspergir 50 mL de AL 0,25% após a depena ou evisceração em carcaças de frango. Entretanto, apesar de ter utilizado um volume de AL próximo ao do presente trabalho e, ainda que em uma concentração inferior, os pesquisadores aplicaram as soluções antes do chiller e com o auxílio de um equipamento de jato sob pressão, diferentemente deste experimento no qual os tratamentos foram realizados após o resfriamento a partir do uso de aspersores manuais no processo.

Sabe-se que a etapa de resfriamento das carcaças leva a contração das dobras, folículos e fissuras da pele, devido a um aparente inchaço, aprisionando e protegendo os micro-organismos e, também, na formação de um filme composto por matéria orgânica que pode reduzir a ação dos descontaminantes (Thomas e McMeekin, 1980). Uma alternativa proposta a essa situação é a associação de surfactantes aos ácidos orgânicos, uma vez que estas substâncias podem atuar reduzindo a tensão superficial na camada de água presente na pele, permitindo a remoção física dos lipídios e outros materiais que estejam protegendo os micro-organismos, facilitando a remoção mecânica e a ação das soluções antibacterianas (Thomas e McMeekin, 1980; Hinton e

Cason, 2008). Outra substância frequentemente associada ao AL é o lactato de sódio, um sal derivado do AL que, ao ser adicionado a este ácido fraco, promove um efeito tampão à solução (ácido fraco + base conjugada) que se torna mais estável ao armazenamento e mais resistente às mudanças de pH do meio. Zeitoun e Debevere (1990) observaram reduções nas contagens de psicrotróficos, bactérias produtoras de sulfeto de hidrogênio e *Enterobacteriaceae* ao aspergirem 20 mL de AL tamponado a 5%, 7,5% e 10%, em coxas de frangos armazenadas por seis dias sob refrigeração. Os pesquisadores também observaram um maior efeito descontaminante em coxas tratadas por aspersão de AL tamponado do que naquelas imersas em AL não tamponado. Burfoot e Mulvey (2011) também observaram reduções nas contagens de mesófilos aeróbios ao utilizarem AL 4% tamponado em carcaças de frangos armazenadas por nove dias sob refrigeração.

Sinhamahapatra *et al.* (2004) observaram reduções nas contagens de coliformes e mesófilos aeróbios nas primeiras 24h após a aspersão de AL 2% por 30 segundos em carcaças de frangos, entretanto, após 48h de armazenamento sob refrigeração, não foram mais detectadas diferenças entre os tratamentos. Esse efeito é também conhecido como “efeito Jameson” que tem como base as etapas do crescimento bacteriano. Após a fase inicial de adaptação, os micro-organismos utilizam os recursos nutricionais com o objetivo de maximizar o crescimento populacional. No entanto, em um dado momento, ocorre o esgotamento dos recursos ambientais e o número de morte celular é equivalente ao número de novas células, etapa conhecida como Fase Estacionária. Como no presente experimento foram realizadas análises microbiológicas apenas no sétimo dia de armazenamento, não foi possível observar se houve um prolongamento inicial na fase de adaptação no grupo tratado em relação ao grupo controle e, com o passar dos dias, a multiplicação celular no grupo controle atingiu o seu máximo devido à escassez de nutrientes, antes das bactérias nos grupos tratados, que continuaram a multiplicação até que, ao final dos sete dias, ambos os grupos, tratados e controle, apresentaram um nível próximo de concentração bacteriana (Jameson, 1962; Cornu *et al.*, 2011). Outro fator a ser considerado é a possibilidade de um efeito tamponante das proteínas musculares resultantes do processo de deterioração natural da carne que neutralizam os ácidos orgânicos devido à formação de compostos básicos, diminuindo o poder residual do AL e reduzindo sua atividade bactericida.

### **5.1.2. Pesquisa de *Listeria spp.* e *Salmonella spp.***

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das análises de *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.* nas carcaças de frango de corte após a aspersão de água e ácido láctico a 5% e 7% e seu armazenamento a 4°C por sete dias. Do total de carcaças analisadas, 14 (15,5%) foram positivas para *L. monocytogenes*. Em relação aos tratamentos, o grupo controle apresentou a maior contaminação para este micro-organismo com 20,0% de carcaças positivas, seguido do AL 5% com 16,7% e o AL7% com 10,0% de carcaças positivas. Não foi observada a presença desta bactéria na 4ª e 5ª semana de coleta, em nenhum dos tratamentos e, também, na 3ª e 1ª semana, respectivamente, nos tratamentos AL5% e AL7%. Essa oscilação observada na detecção desse micro-organismo durante as seis semanas de coletas de amostras, pode ser devido a sua capacidade de formar biofilmes e de entrar em estado de latência, podendo resistir aos processos de limpeza e sanitização, bem como a condições ambientais adversas, como alto teor de sal ou acidez, baixa umidade ou baixo teor de oxigênio, sobrevivendo por longos períodos no ambiente industrial, contaminando de forma contínua ou intermitente os produtos de origem animal (McLauchlin *et al.*, 2004).



**Tabela 2.** Número de amostras positivas, em porcentagem, para *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em carcaças de frango após aspersão de ácido láctico aspersão de água (controle) e ácido láctico a 5% e 7%.

Parâmetro	Controle (%)	AL 5% (%)	AL 7% (%)
<i>L. monocytogenes</i>	20,0	16,7	10,0
<i>Salmonella</i> spp.	16,7	20,0	20,0

AL 5%: ácido láctico 5%; AL 7%: ácido láctico 7%

Kabuki (1997) encontrou valores superiores (70,0%) em relação à presença de *L. monocytogenes*, ao analisar carcaças e peito de frango coletados no comércio de Campinas. Por outro lado, Barbalho *et al.* (2005) encontraram uma incidência de 14,3% para este micro-organismo em carcaças provenientes de um frigorífico abatedouro do estado da Bahia, resultados semelhantes aos observados neste experimento (15,5%). Entretanto, Nalério *et al.* (2009) encontraram uma incidência de 33,3% de *L. monocytogenes* em amostras de carcaças resfriadas coletadas em um frigorífico e, segundo eles, estes valores refletem a disseminação deste patógeno dentro das indústrias, bem como a dificuldade de sua eliminação do ambiente industrial.

Nos resultados das análises de *Salmonella* spp., das 90 carcaças coletadas, 17 (18,9%) apresentaram contaminação por esse patógeno. Não foi observada a presença deste micro-organismo nas carcaças de frango analisadas na 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> semana. Apenas uma carcaça em cada tratamento foi positiva para *Salmonella* spp. na 3<sup>a</sup> semana, sendo observada a maior contaminação por esta bactéria na 4<sup>a</sup> semana de coleta, com uma incidência de 93,3% (14/15) de carcaças positivas nesta semana e 82,3% (14/17) das carcaças positivas de todo o experimento. Esses resultados evidenciam a importância das boas práticas de manejo, em especial nas granjas produtoras, para o controle desse patógeno nos animais, pois possivelmente, o número elevado de amostras positivas na 4<sup>a</sup> semana seja resultado de um lote de aves positivas para essa bactéria. Por serem portadoras assintomáticas as aves têm papel de destaque na epidemiologia das salmonelas entéricas, podendo veicular essas bactérias ao longo de toda a cadeia produtiva, contaminando outras carcaças, equipamentos e utensílios, bem como, outros produtos alimentícios. A relevância do controle deste patógeno é evidenciada pelos programas implementados pelo governo brasileiro com o intuito de monitorar a prevalência dessas bactérias nos plantéis avícolas e nas carcaças de frangos (Brasil, 2003; Brasil, 2012; Brasil, 2016).

Valores inferiores aos do presente trabalho foram encontrados por Duarte *et al.* (2009) ao analisarem carcaças provenientes de cinco abatedouros localizados no Nordeste do Brasil, onde observaram uma prevalência de 9,6% para *Salmonella* spp., bem como Borsoi *et al.* (2010) que observaram uma prevalência de 12,2% ao analisarem carcaças refrigeradas, coletadas no varejo do estado do Rio Grande do Sul. Por outro lado, Alali *et al.* (2012) e Siriken *et al.* (2015) observaram valores superiores, encontrando respectivamente, uma incidência de 31,5% e 42,6% de amostras positivas ao analisarem amostras de carne de frango obtidas no varejo.

Nos EUA e UE, o sistema de avaliação de *Salmonella* spp. em carcaças de frango permite uma positividade máxima de 23,5% (FSIS, 1996) e de 14,0% (EC, 2005), respectivamente. Da mesma forma, a legislação brasileira prevê o monitoramento das carcaças de frango em relação à presença deste micro-organismo. A Instrução Normativa nº 20 (Brasil, 2016) atualizou as

diretrizes em relação ao controle e monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais e nos de abate de frangos e perus. Com base nessa nova legislação, espera-se uma prevalência de 20,0% para as bactérias deste gênero, sendo que, em um estabelecimento com capacidade de abate diária superior a cem mil frangos e galinhas, se aceita o máximo de 12 amostras positivas em 51 amostras analisadas. Dessa forma, com base nestes valores, os resultados encontrados no presente trabalho encontram-se dentro dos objetivos estabelecidos pela legislação nacional, no entanto, estes resultados expõem a necessidade de melhorias nas práticas de controle e boas práticas de produção, principalmente nos estabelecimentos avícolas, uma vez que um único lote de animais contaminados pode contaminar toda instalação e, também, outros lotes de aves.

Diversos trabalhos relatam a redução ( $p < 0,05$ ) de *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. em carcaças de frangos após aplicação de AL. Entretanto, grande parte desses autores realizou a inoculação de altas contagens dessas bactérias como, por exemplo, Kanellos e Burriel (2005), analisando o efeito bactericida de AL 1,5% contra  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> de diferentes estirpes de *Salmonella* spp. (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Indiana*) ou Anang *et al.* (2007), ao imergir peitos de frango, inoculados com  $10^7$ - $10^8$  UFC g<sup>-1</sup> de *L. monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7 e *S. Enteritidis*, em AL 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0% por 10, 20 ou 30 minutos. Contudo, semelhante ao presente trabalho, nenhum dos tratamentos foi eficiente para eliminar os micro-organismos (Kanellos e Burriel, 2005; Anang *et al.*, 2007; Lecompte *et al.*, 2008; Lecompte *et al.*, 2009; Zaki *et al.*, 2015).

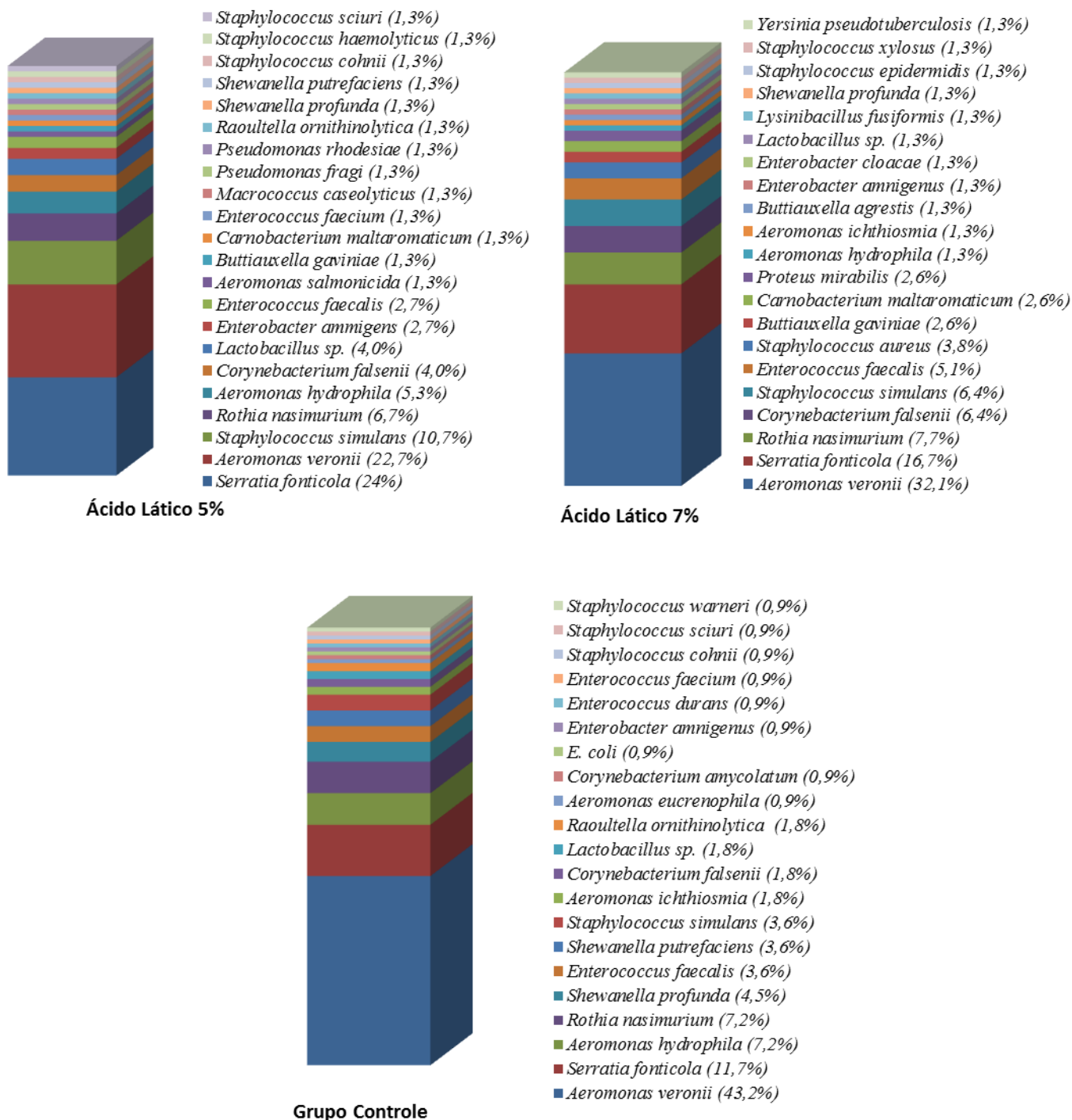
## 5.2. Identificação proteômica

### 5.2.1. *Staphylococcus* spp.

Foram coletadas das placas de cultura com o ágar Baird Parker 280 colônias morfotipicamente distintas para caracterização e identificação da microbiota presente nas carcaças de frango pela técnica MALDI-TOF e seus resultados estão apresentados no Gráfico 3. Do total de colônias coletadas, foram identificadas mais de 35 espécies, sendo *Aeromonas veronii* (35%) e *Serratia fonticola* (15,7%) as mais frequentes em todos os tratamentos.

Apenas 28 (10,0%) colônias coletadas foram classificadas como do gênero *Staphylococcus* spp., identificadas como das espécies *S. simulans* 17 (60,7%), *S. aureus* 3 (10,7%), *S. cohnii* 2 (7,14%), *S. sciuri* 2 (7,14%), *S. epidermidis* 1 (3,58%), *S. haemolyticus* 1 (3,58%), *S. warneri* 1 (3,58%) e *S. xylosum* 1 (3,58). Apenas em uma carcaça, do grupo tratado com AL 7%, foi observada a presença de *S. aureus*. Resultados semelhantes foram observados por Nagase *et al.* (2002) que identificaram as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. xylosum*, *S. cohnii*, *S. sciuri*, *S. lentus* e *S. saprophyticus* em amostras da pele de galinhas coletadas no Japão. Entretanto, Menezes (2013) ao analisar bioquimicamente pelo sistema Vitek<sup>TM</sup> 94 colônias isoladas em ágar Baird Parker a partir de amostras de carcaças de frangos produzidas no estado de Minas Gerais, identificou 52,0% como do gênero *Staphylococcus* spp. (30,6% *S. aureus*, 26,6% *S. warneri*, 10,2% *S. saprophyticus*, 8,2% *S. chromogenes*, 6,2% *S. epidermidis*, 4,1% *S. sciuri* e *S. simulans* e 2,0% *S. caprae*, *S. cohnii*, *S. equorum*, *S. hominis* e *S. lugdunensis*) e 48,0% de outros gêneros, como *Enterococcus* spp., *Rothia* spp., *Streptococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp. e *Yersinia* spp.

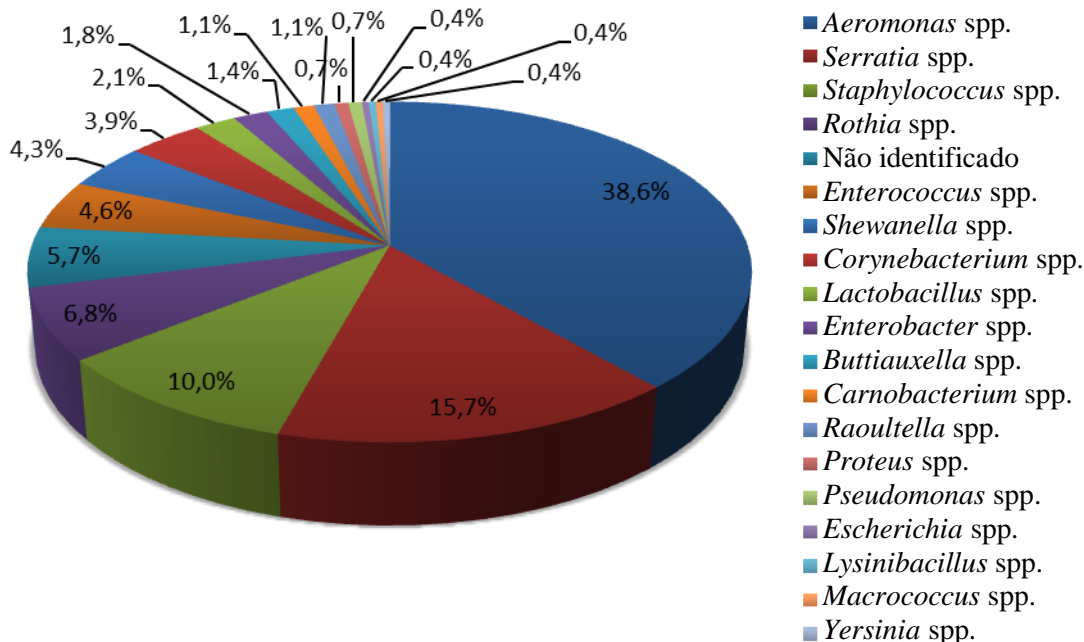
**Gráfico 3:** Relação de espécies identificadas em carcaças de frango após aspersão de água e ácido láctico a 5% e 7% e cultivadas em Ágar Baird-Parker (BP)



As espécies SCP são tidas como as de maior importância para a saúde pública, devido à associação entre a presença da enzima coagulase e a capacidade de produção de enterotoxinas. Dentre as espécies SCP, *S. aureus* é a principal associada à DTAs, responsável por 37,0% de todas as intoxicações alimentares bacterianas nos Estados Unidos (1998-2008) e por 21,6% de todas as doenças bacterianas de origem alimentar no Brasil entre os anos de 2007 e 2017 (Bennett *et al.*, 2013; Brasil, 2017). Entretanto, a relação entre a produção de enterotoxinas e a presença da enzima coagulase não é absoluta. Diversas espécies SCN encontradas no presente trabalho, como *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* e *S. simulans*, já foram identificadas como portadoras de genes responsáveis pela produção dessas substâncias (Bautista *et al.*, 1988; Cunha *et al.*, 2006; Veras *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2011). Sendo assim, a presença dessas bactérias nas carcaças de frangos constitui um alerta quanto à necessidade da implementação de técnicas específicas para a detecção da capacidade de produção das enterotoxinas e não apenas da produção da enzima coagulase.

Em relação às espécies de SCN, *S. epidermidis* é a mais encontrada na microbiota autóctone ou como causadora de infecções hospitalares em seres humanos. A produção de biofilme é o principal fator de virulência desta espécie uma vez que, além de atuar como um reservatório de bactérias aderido às superfícies, o biofilme dificulta a penetração e difusão de antimicrobianos e elementos de defesa do organismo. Devido a essas características, esta espécie é de grande importância em pacientes com cateteres e demais implantes cirúrgicos (Bueris *et al.*, 2004; Trabulsi *et al.*, 2004).

**Gráfico 4:** Relação dos gêneros bacterianos identificados em carcaças de frango após aspensão de água e ácido láctico a 5% e 7% e cultivados em Ágar BP



Dentre os gêneros, *Aeromonas* spp., *Serratia* spp. e *Staphylococcus* spp. foram os mais frequentes, correspondendo a 38,5%, 17,7% e 10,0% dos isolados, respectivamente, como apresentado no gráfico 4. Das 108 colônias classificadas como do gênero *Aeromonas* spp., *A. veronii* foi a principal identificada, em 83,3% colônias, seguida da *A. hydrophila* 12,0%, *A.*

*ichthiosmia* 2,7%, *A. eucrenophila* 1,0% e *A. salmonicida* 1,0% (gráfico 3). Essas bactérias podem ser isoladas de aves, habitats aquáticos, alimentos, animais domésticos, espécies de invertebrados e solo e apresentam a capacidade de crescimento em alimentos crus, cozidos e processados, em uma ampla faixa de pH (4,5 a 9) e mesmo que armazenados sob refrigeração (Devlieghere *et al.*, 2000; Isonhood e Drake, 2002; OMS, 2011). Dentre as espécies encontradas, duas (*A. hydrophila*, *A. veronii*) são reconhecidas como patógenos humanos, no entanto, pouco se sabe acerca do real impacto destas bactérias em relação aos casos de doenças transmitidas por alimentos (Janda e Abott, 1998; Igbinsosa *et al.*, 2012). No entanto, mesmo com dados escassos, essas bactérias têm sido associadas a várias doenças em humanos e animais, sendo implicadas como causadoras de gastroenterites e infecções extra-intestinais como, por exemplo, pneumonia, síndrome hemolítica urêmica, peritonites, infecções de feridas, sepses biliares e septicemias (Pereira *et al.*, 2004; Martins *et al.*, 2009).

Neyts *et al.* (2000) encontraram incidência de 83,3%, 64,3% e 66,7% para *Aeromonas* spp. ao analisarem amostras de carnes de aves, carne vermelha e derivados cárneos, respectivamente. Os pesquisadores observaram uma predominância das espécies *A. hydrophila* (37,0%), *A. veronii* biovar sobria (19,0%) e *A. caviae* (12,0%). De modo semelhante Costa e Rossi Júnior (2002) observaram uma incidência de 36,0%, 56,0%, 72,0%, 72,0%, 80,0% e 72,0% para este gênero, ao analisarem material proveniente de diferentes pontos da linha de processamento (penas, fezes, carcaça não eviscerada, carcaça eviscerada, água de pré-resfriamento e carcaça resfriada, respectivamente). As espécies *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae* e *A. veronii* foram encontradas em todas as etapas avaliadas. Das amostras analisadas pelos pesquisadores, apenas as provenientes da água de abastecimento e da água de escaldagem foram negativas para este micro-organismo. Para os pesquisadores, a presença dessas bactérias nas fezes das aves sugere que estas são portadoras assintomáticas do micro-organismo, sendo uma possível fonte de contaminação dos demais animais durante o transporte e processamento.

A família *Enterobacteriaceae* foi a segunda mais incidente (21,4%) nos resultados encontrados (Gráfico 4), sendo as principais espécies *Serratia fonticola* 44 (73,3%) e *Enterobacter amnigenens* 5 (6,7%). Esta família abriga espécies disseminadas no ambiente, sendo encontradas em associação aos animais, fazendas e indústria, podendo causar doenças entéricas, veiculadas por alimentos, e extra-entericas, sendo incriminadas em, aproximadamente, 50,0% das infecções hospitalares.

Existem diversos meios de cultura para a pesquisa de *Staphylococcus* spp., no entanto, o ágar BP é o mais utilizado para a enumeração e isolamento de SCP em alimentos como metodologia de avaliação do risco de intoxicação alimentar (Baird e Lee 1995). O cultivo e seleção das bactérias estafilocócicas neste ágar se dá a partir da gema de ovo, que permite a formação de um halo claro em torno das colônias de *S. aureus* como resultado da sua lipólise e proteólise; da formação de um precipitado branco dentro das zonas clara como resultado da precipitação de sais de cálcio, magnésio e de ácidos graxos liberados pela hidrólise da gordura; do cloreto de lítio e o telurito de potássio que atuam inibindo a microbiota acompanhante, sendo que a redução do telurito de potássio a telurio resulta no enegrecimento das colônias de *S. aureus*; e, por fim, o piruvato e a glicina presentes no meio estimulam o crescimento dos estafilococos (Hrušková, 2012). Todavia, apesar de oferecer uma produtividade satisfatória nos estudos bacteriológicos, a seletividade do ágar BP é muitas vezes criticada uma vez que apenas as colônias de *S. aureus* positivo para lipase e lecitinase podem ser facilmente reconhecidas (Tham e Hajdu, 1987). Cepas lecitinase negativo requerem etapas adicionais como, por exemplo, o teste da coagulase, para diferenciação de gêneros como *Bacillus* spp., *Proteus* spp.,

*Enterococcus* spp. e *Micrococcus* spp. (Baird e Lee, 1995). Contudo, tais etapas tornam o método demorado e impreciso, tendo em vista a existência de outras espécies dentro do gênero *Staphylococcus* que podem ser positivas no teste de coagulase, além do *S. aureus*, sem apresentarem produção de enterotoxinas, bem como bactérias coagulase negativa neste teste e que produzem toxinas patogênicas aos seres humanos (Buyser *et al.*, 1998; Savini *et al.*, 2013).

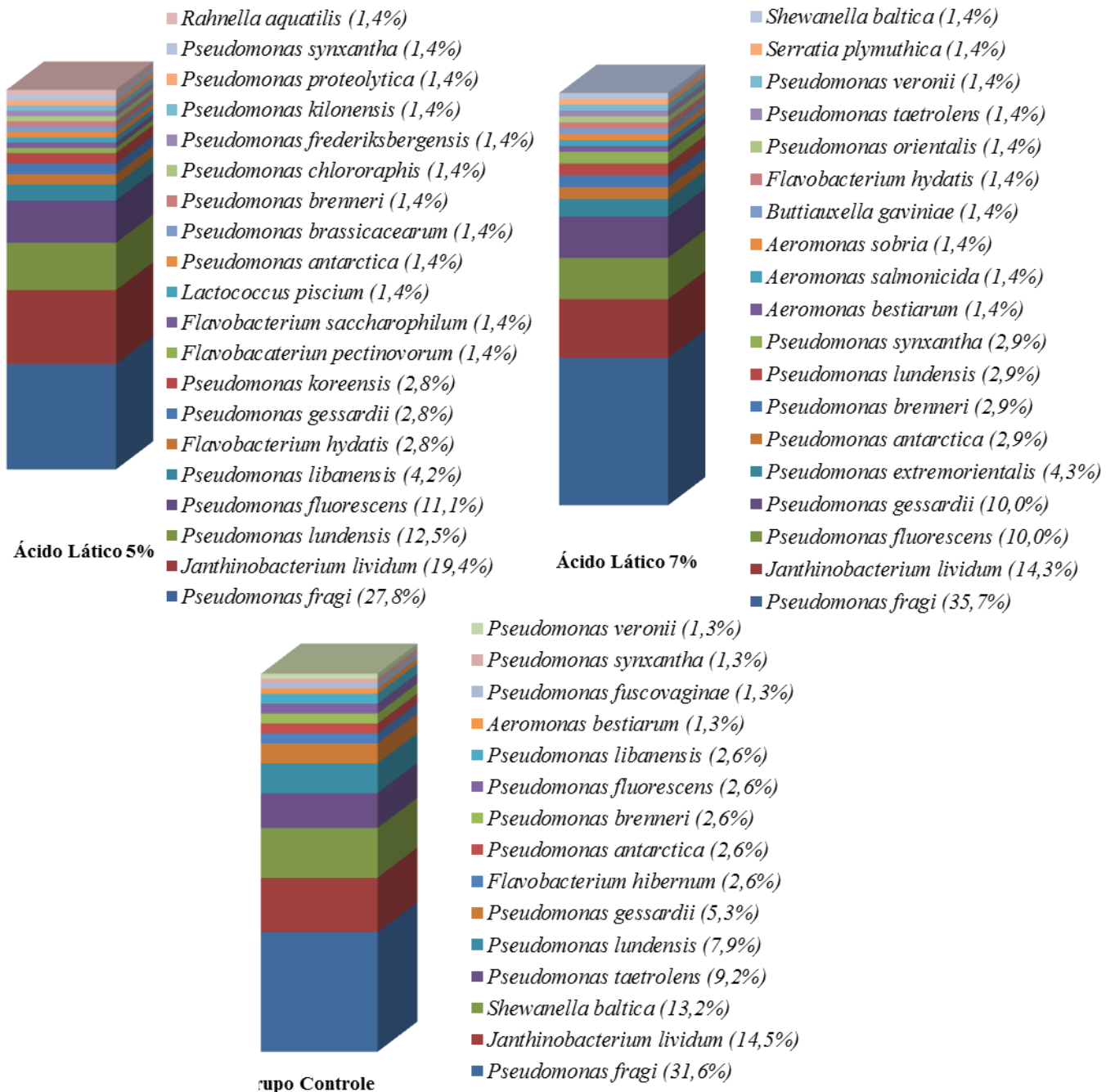
Do total de colônias coletadas para análise, 16 (5,7%) não foram identificadas. Na metodologia EM MALDI – TOF utilizada, o processo de identificação de micro-organismos emprega critérios baseados em pontuações (escores) de confiança que vão de 0,00 a 3,00 e com base nesses critérios, pontuações inferiores a 1,7 não permitem a identificação confiável do micro-organismo. Dentre os fatores que podem prejudicar esse processo de identificação, a principal é a necessidade de impressões de massas peptídicas de referência específicas em um banco de dados, o que pode limitar a identificação de novos isolados (Höll *et al.*, 2016; Dec *et al.*, 2016). Além disso, condições de cultivo ou do tempo da cultura, bem como os protocolos de preparo de amostra, parâmetros de medida e identificações de biomarcadores, também podem atuar de forma negativa, impedindo a identificação do micro-organismo (Mazzeo *et al.*, 2006; Dušková *et al.*, 2012).

No presente estudo pode-se observar a presença de uma grande variedade de bactérias de diferentes gêneros e espécies no ágar BP, sendo as do gênero *Aeromonas* spp. as que apresentaram melhor capacidade de desenvolvimento. Tais resultados evidenciam a baixa seletividade do meio e a necessidade de estudos para o desenvolvimento de um meio de cultivo com maior seletividade para *Staphylococcus* spp. e do desenvolvimento de técnicas acessíveis para a identificação de cepas com capacidade de produção de SE, oferecendo resultados mais rápidos e confiáveis, tendo em vista a relevância sanitária destas bactérias para a saúde pública.

### **5.2.2. Micro-organismos psicrotróficos**

Foram coletadas, das placas de cultura com Ágar Padrão para Contagem, 251 colônias morfotipicamente distintas para caracterização e identificação da microbiota presente nas carcaças de frango pela técnica MALDI-TOF e, conforme apresentado no Gráfico 5, dentre as espécies do gênero *Pseudomonas* spp., as principais identificadas foram *P. fragi* (44,0%), *P. fluorescens* (10,8%), *P. lundensis* (10,8%) e *P. gessardii* (8,3). As bactérias deste gênero são as principais responsáveis pelo processo de deterioração em carnes refrigeradas (ICMSF, 2005) e tem como característica serem aeróbios rigorosos. Tais afirmações estão em consonância aos resultados observados, tendo sido encontrado uma predominância das bactérias deste gênero (62,5%) em relação às demais bactérias psicrotróficas, o que pode ter sido favorecido pelo armazenamento das carcaças de frangos em embalagens permeáveis ao oxigênio. Essas bactérias estão disseminadas no ambiente, podendo atuar como agentes patogênicos oportunistas em humanos, plantas e animais e como agentes de deterioração em carne e derivados. Dentre as espécies associadas a infecções em humanos, apenas *P. fluorescens* foi identificada entre os isolados (Iglewski, 1996).

**Gráfico 5:** Relação das espécies identificadas em carcaças de frango após aspersão de água e ácido láctico a 5% e 7%, cultivados em Ágar Padrão para Contagem e incubados durante dez dias a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$

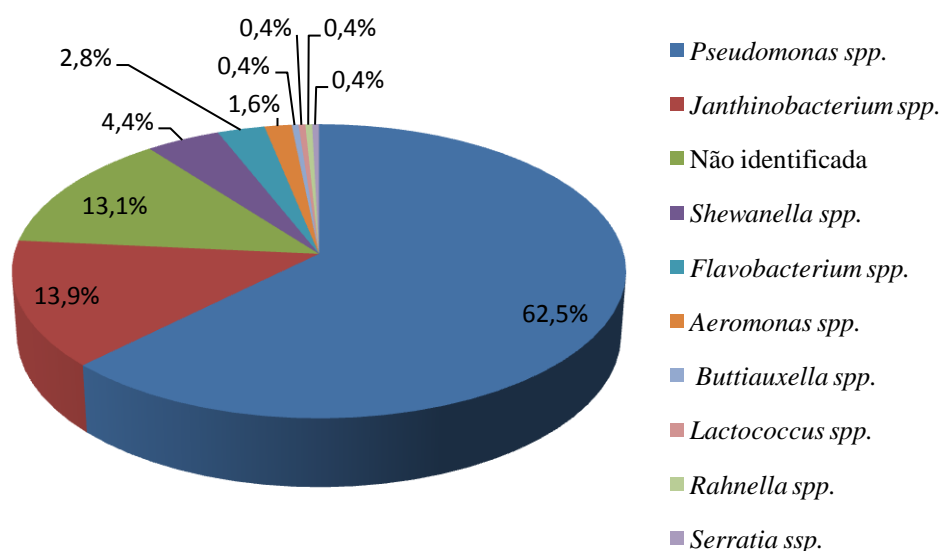


*P. fragi* foi o micro-organismo mais incidente em todos os tratamentos (Gráfico 5), correspondendo a, aproximadamente, 31,7% das cepas cultivadas no ágar PCA. Esses resultados são condizentes com os apresentados por Arnaut-Rollier *et al.* (1999) e Rouger *et al.* (2017) que

afirmaram ser *P. fragi* a espécie mais frequentemente isolada deste gênero em carnes de aves armazenadas sob refrigeração.

*Janthinobacterium lividum* foi o segundo micro-organismo mais presente, correspondendo a 14,0% dos isolados. Esse micro-organismo apresenta-se em forma de bastão Gram-negativo, é aeróbio, móvel, anteriormente definido como *Chromobacterium lividum*, podendo ser isolado de diversas fontes ambientais como solos, rios e lagos, incluindo regiões polares, como a Antártida. Esta bactéria foi associada a casos de infecções hospitalares por Patijanasoontorn *et al.* (2000) em nove pacientes internados em unidade de terapia intensiva. O estudo epidemiológico realizado pelos pesquisadores mostrou que *J. lividum* foi isolado a partir de enxaguante bucal, água destilada utilizada para umidificação de ventiladores e limpeza de tubos de sucção traqueal e em garrafas e seringas na unidade de terapia intensiva. Além disso, algumas cepas desta espécie foram identificadas como produtoras da enzima metalo- $\beta$ -lactamase que é responsável por conferir resistência microbiana a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, podendo ser um importante reservatório ambiental de determinantes de resistência a antibióticos (Rossolini *et al.*, 2001).

**Gráfico 6:** Relação dos gêneros bacterianos identificados em carcaças de frango após aspersão de água e ácido láctico a 5% e 7%, cultivados em Ágar Padrão para Contagem e incubados durante dez dias a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$



No Gráfico 6 estão relacionados os gêneros observados e a representatividade de cada um no total de colônias identificadas. Aproximadamente 157 (62,5%) pertenciam ao gênero *Pseudomonas spp.* e 35 (14,0%) ao gênero *Janthinobacterium spp.*

Os resultados deste trabalho são semelhantes aos observados por Hinton Jr. *et al.* (2004) que encontraram *Pseudomonas spp.* como o gênero predominante em carcaças de frango refrigeradas por sete dias e também observaram a presença de várias espécies de bactérias como *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas*



*hydrophila*, *Aeromonas salmonicida-masoucida*, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas sobria*, *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*.

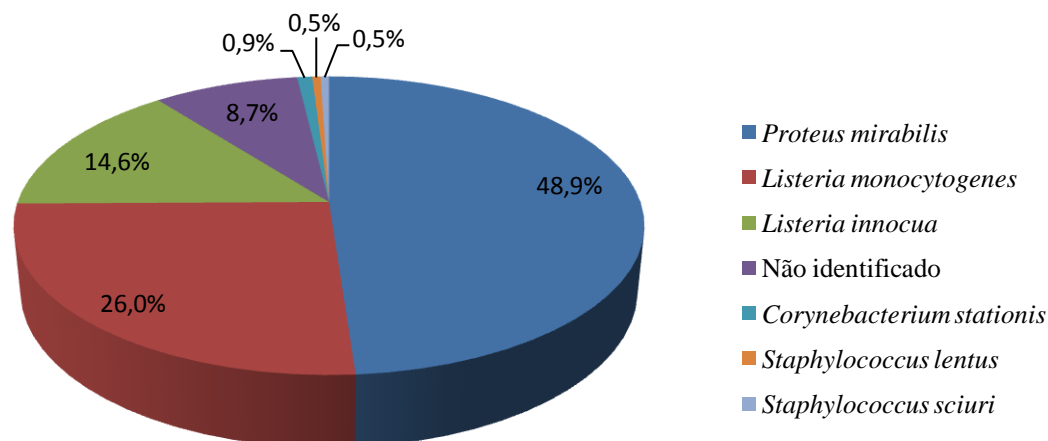
Do total de colônias coletadas para identificação, 33 (13,1%) não foram identificadas. Como dito anteriormente, com base nos critérios de identificação, pontuações inferiores a 1,7 não permitem a identificação confiável do micro-organismo e, dentre os fatores que podem prejudicar esse processo de identificação, a principal é a necessidade de impressões de massas peptídicas de referência específicas em um banco de dados, o que pode limitar a identificação de novos isolados (Höll *et al.*, 2016; Dec *et al.*, 2016). Além disso, condições de cultivo ou do tempo da cultura, bem como os protocolos de preparo de amostra, parâmetros de medida e identificações de biomarcadores, também podem atuar de forma negativa, impedindo a identificação do micro-organismo (Mazzeo *et al.*, 2006; Dušková *et al.*, 2012). Dessa forma, a taxa elevada de isolados não identificados neste estudo pode ser um indicador do alto número de espécies presentes na microbiota das carcaças de frangos que ainda precisam ter suas impressões peptídicas identificadas, bem como uma possível influência do meio ou da técnica utilizada, sendo interessante a realização de estudos complementares. É interessante ressaltar que, embora não esteja bem elucidada na literatura a real necessidade do uso de colônias frescas para uma melhor identificação (Mazzeo *et al.*; 2006), havendo trabalhos que relatam que o tempo de cultura não influencia na capacidade de identificação microbiana pela técnica EM MALDI-TOF (Carbonnelle *et al.*, 2007), durante as análises de micro-organismos psicrotópicos as placas ficaram incubadas durante dez dias a  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ , antes da leitura e coleta das colônias, o que pode ter contribuído para a não identificação de algumas delas. Nos outros meios de culturas utilizados durante o experimento e incubados por um período menor, como Ágar Palcam, Ágar BP e Ágar Rambach apresentaram, respectivamente 8,7%, 5,7% e 1,12% de colônias não identificadas.

### 5.2.3. *Listeria monocytogenes*

Foram coletadas, das placas de cultura com Ágar Palcam, 219 colônias morfotipicamente distintas para caracterização e identificação da microbiota presente nas carcaças de frango pela técnica MALDI-TOF e, seus resultados estão apresentados no Gráfico 7. Apenas seis espécies foram identificadas, das quais 107 colônias (48,8%) eram *Proteus mirabilis*, 57 (26,0%) *L. monocytogenes*, 32 (14,6%) *L. innocua*, duas (1,0%) *Corynebacterium stationis*, uma (0,5%) *Staphylococcus sciuri* e uma (0,5%) *S. lentus*.

*Proteus mirabilis* foi a espécie mais frequente nos isolados identificados. Este micro-organismo é um bacilo anaeróbio facultativo, Gram-positivo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, encontrado abundantemente no solo, água e intestino de humanos, sendo associado a infecções em ambiente hospitalar, principalmente do trato urinário de pacientes com cateteres, podendo causar uretrite, cistite, prostatite, pielonefrite e cálculos renais (Foris e Snowden, 2017). Além dos danos causados à vida humana, as infecções hospitalares prolongam o tempo de internação dos pacientes aumentando, dessa forma, o custo da assistência médica (Guentzel, 1996).

**Gráfico 7:** Relação das espécies identificadas em carcaças de frango após aspersão de água e ácido láctico a 5% e 7% e cultivados em Ágar Palcam



*L. monocytogenes* são importantes patógenos emergentes, disseminados no ambiente industrial e nos animais, sendo o agente causador da listeriose, que pode se espalhar além do trato gastrointestinal. Ainda que a legislação brasileira não estabeleça parâmetros em relação a sua presença nas carcaças de frango, legislando apenas em relação aos produtos de origem animal prontos para consumo, a presença deste patógeno nas carcaças cruas apresenta-se como um risco para a saúde pública devido à possibilidade da ocorrência de recontaminação de produtos processados nas fábricas e de contaminação cruzada na cozinha, podendo se espalhar para alimentos cozidos ou outros itens, e se desenvolver mesmo sob condições de refrigeração. Com uma alta taxa de mortalidade (40,0%) e de hospitalização (99,0%), *L. monocytogenes* foi responsável por aproximadamente 23 mil casos de listeriose no mundo em 2010, com mais de 5.463 mortes (De Noordhout *et al.*, 2014), sendo considerado o patógeno mais mortal entre os isolados em surtos de doenças de origem alimentar nos Estados Unidos (Crowe *et al.*, 2015; Buchanan *et al.*, 2017), afetando principalmente idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos e pessoas com sistema imunológico enfraquecido (Roasto *et al.*, 2012; CDC, 2017b). Apenas no ano de 2010, ocorreram mais de 23 mil casos de listeriose no mundo, com mais de cinco mil mortes (de Noordhout *et al.*, 2014).

Apesar de *L. innocua* ser considerada como não patogênica para humanos, tem sido proposto que essa bactéria evoluiu de um ancestral comum com *L. monocytogenes*, diferindo desta apenas pela perda de genes de virulência. No entanto, diversos autores têm identificado essa bactéria como a causadora de doenças em humanos (Perrin *et al.*, 2003; Favaro *et al.*, 2014) e, também, cepas atípicas de *L. innocua* portadoras de genes codificadores de fenótipos hemolíticos de virulência (Clayton *et al.*, 2014). Além disso, sua identificação é um bom indicador da presença de *L. monocytogenes*, sinalizando falhas nos processos de limpeza e sanitização (Nalério *et al.*, 2009).

A incidência da *L. monocytogenes* no ambiente industrial e nos alimentos é de difícil controle, sendo comum a sua presença na carne crua de frango. Apesar da dose infectante necessária para ocorrência da infecção ser alta ( $1,9 \times 10^6$ ), a capacidade de crescimento deste micro-organismo frente a situações adversas como, temperaturas de refrigeração e baixo pH, associado à

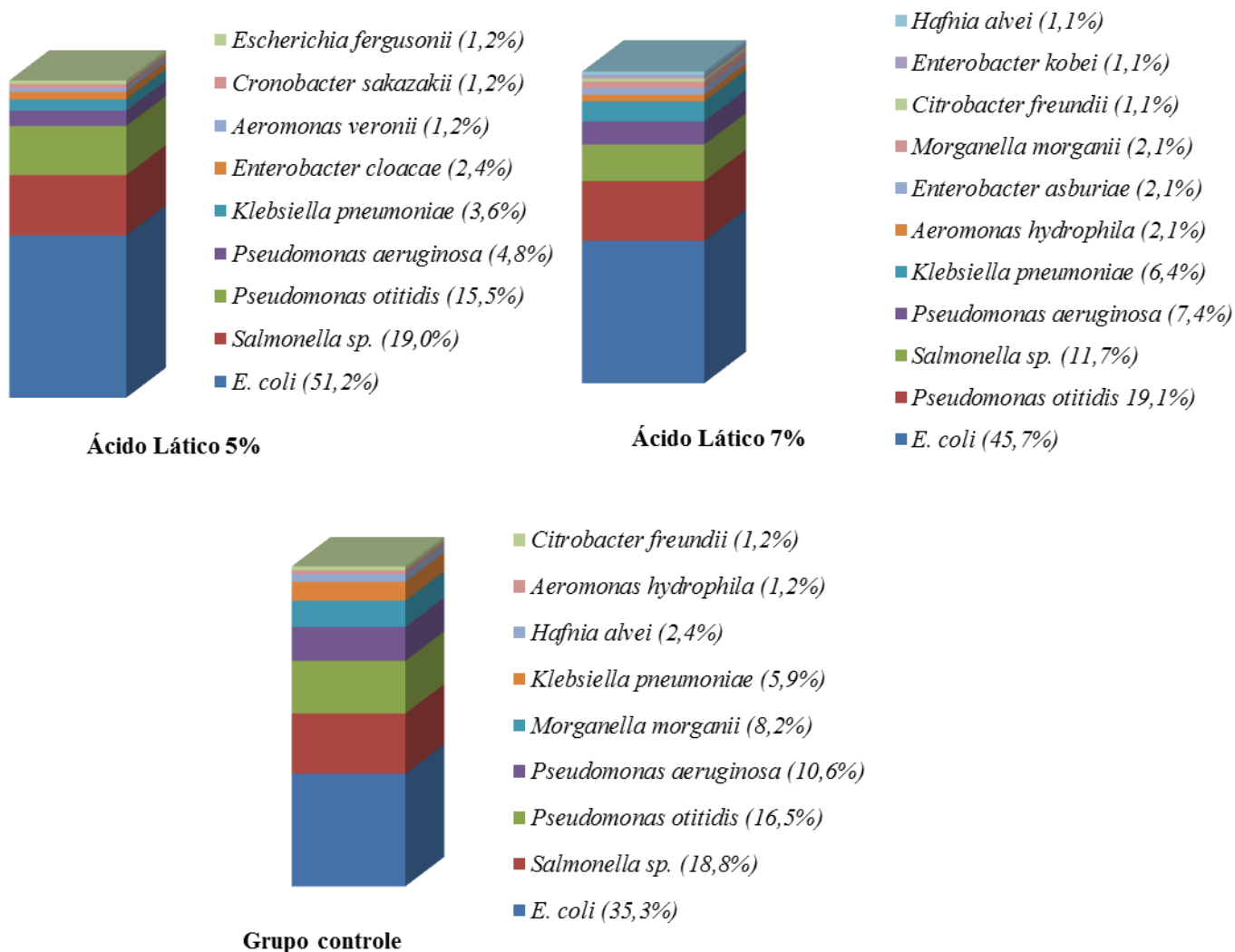
resistência aos produtos sanitizantes devido à produção de biofilme, faz com que a presença deste patógeno no ambiente industrial e nos alimentos seja difícil de ser controlada, constituindo um risco para a saúde pública (FAO/WHO, 2004; Mead, 2004; de Noordhout *et al.*, 2014; Faúla *et al.*, 2015). Dados desta natureza reforçam a importância do monitoramento e controle dessa bactéria ao longo da cadeia produtiva de alimentos.

Do total de colônias coletadas para a análise, 19 (8,7%) não foram identificadas. Como dito anteriormente, com base nos critérios de identificação, pontuações inferiores a 1,7 não permitem a identificação confiável do micro-organismo e, dentre os fatores que podem prejudicar esse processo de identificação, a principal é a necessidade de impressões de massas peptídicas de referência específicas em um banco de dados, o que pode limitar a identificação de novos isolados (Höll *et al.*, 2016; Dec *et al.*, 2016). Além disso, condições de cultivo ou do tempo da cultura, bem como os protocolos de preparo de amostra, parâmetros de medida e identificações de biomarcadores, também podem atuar de forma negativa, impedindo a identificação do micro-organismo (Mazzeo *et al.*, 2006; Dušková *et al.*, 2012).

#### **5.2.4. *Salmonella* spp.**

Foram coletadas das placas de cultura com Ágar Rambach 266 colônias morfotipicamente distintas para caracterização e identificação da microbiota presente nas carcaças de frango pela técnica MALDI-TOF e, seus resultados em relação às espécies e gêneros bacterianos identificados estão apresentados, respectivamente, nos Gráficos 8 e 9. Das 266 colônias analisadas, as espécies mais frequentes foram *Escherichia coli*, em 116 (44,0%) isolados, *Pseudomonas otitidis* em 45 (16,9%) e *Pseudomonas aeruginosa* em 20 (7,5%) dos isolados (Gráfico 8).

**Gráfico 8:** Relação das espécies identificadas em carcaças de frango após aspersão de água e ácido láctico a 5% e 7% e cultivados em Ágar Rambach

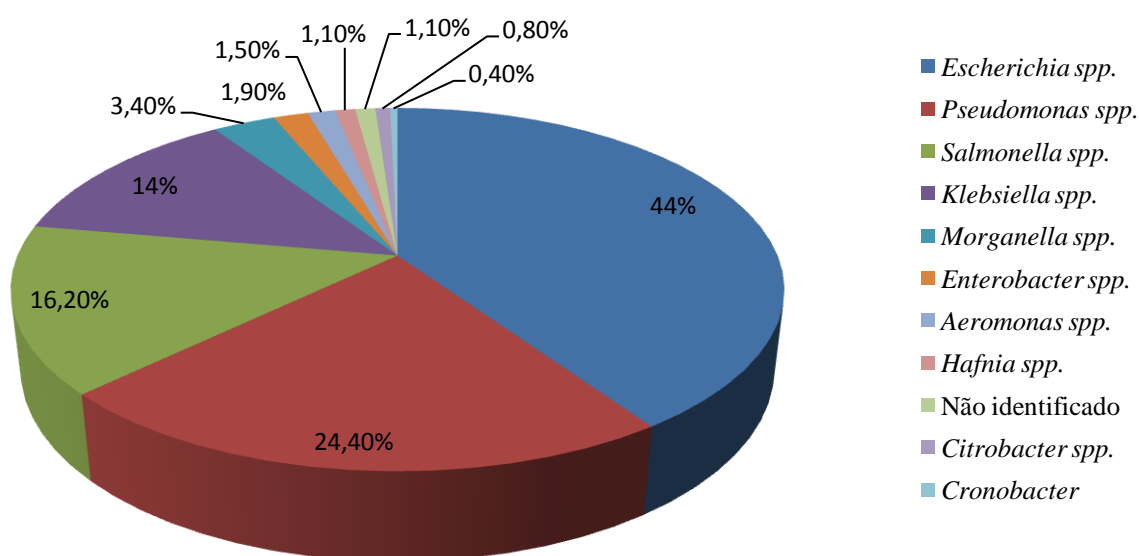


O gênero *Salmonella* spp. é formado por duas espécies, várias subespécies e diversos sorogrupos, dos quais *S. enterica* subsp. *enterica* sorotipos Enteritidis, Infantis, Typhimurium e Heidelberg são os mais prevalente em carcaças de frangos no Brasil (Brasil, 2012). Sendo assim, é de grande relevância a soro identificação destas bactérias, para uma real dimensão do risco associado a essa contaminação. Ainda que a técnica MALDI-TOF seja relatada por diversos pesquisadores como uma ferramenta valiosa para a identificação de bactérias patogênicas e deteriorantes veiculadas por alimentos (Mazzeo *et al.*, 2006; Dieckmann e Malorny, 2011; Han *et al.*, 2014; Singhal, *et al.*, 2015; Höll *et al.*, 2016), devido à diversidade encontrada nesta espécie, a discriminação no nível de sorotipos de *Salmonella* spp. requer espectros com um elevado número de picos de proteínas, com a combinação de vários

marcadores, dificultando a reprodução da metodologia entre os laboratórios (Dieckmann e Malorny, 2011).

Ainda que a maioria das estirpes de *E. coli* não sejam patogênicas (FSIS, 2015) este micro-organismo é um dos mais importantes em surtos alimentares no Brasil, incriminado em 27% dos casos de DTAs (Brasil, 2017), sendo um importante indicador sanitário dos produtos por sinalizar uma possível contaminação de origem fecal, uma vez que apresentam como habitat primário o intestino de humanos e animais e têm baixa resistência em ambientes extra intestinais, como água e solo.

**Gráfico 9:** Relação dos gêneros bacterianos identificados em carcaças de frango após aspensão de água e ácido lático a 5% e 7% e cultivados em Ágar Rambach



Apenas 43 (16,2 %) colônias foram identificadas como do gênero *Salmonella spp.*, e os gêneros mais frequentes foram *Escherichia spp.*, em 116 (44,0%) isolados e *Pseudomonas spp.* em 65 (30,0%) (Gráfico 9). As bactérias do gênero *Pseudomonas spp.* são as principais responsáveis pelo processo de deterioração estando frequentemente associadas às carnes refrigeradas. Dentre as espécies, *P. aeruginosa* é um importante patógeno humano oportunista, frequentemente associado a infecções em ambientes hospitalares e em pacientes imunocomprometidos, responsável por 51 mil infecções e 400 mortes por ano nos EUA (CDC, 2013).

Do total de colônias coletadas para análise, apenas três (1,12%) não foram identificadas. Como dito anteriormente, com base nos critérios de identificação, pontuações inferiores a 1,7 não permitem a identificação confiável do micro-organismo e, dentre os fatores que podem prejudicar esse processo de identificação, a principal é a necessidade de impressões de massas peptídicas de referência específicas em um banco de dados, o que pode limitar a identificação de novos isolados (Höll *et al.*, 2016; Dec *et al.*, 2016). Além disso, condições de cultivo ou do tempo da cultura, bem como os protocolos de preparo de amostra, parâmetros de medida e identificações de biomarcadores, também podem atuar de forma negativa, impedindo a identificação do micro-organismo (Mazzeo *et al.*, 2006; Dušková *et al.*, 2012).

## 6. CONCLUSÃO

A caracterização da microbiota bacteriana das carcaças de frangos demonstrou a presença de 29 gêneros bacterianos, incluindo gêneros e espécies que representam riscos para saúde pública como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, *A. veronii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* e *Shewanella putrefaciens*. Os gêneros bacterianos mais frequentemente encontrados foram *Pseudomonas* spp., *Escherichia* spp., *Aeromonas* spp., *Proteus* spp. e *Listeria* spp. Foram identificadas também 79 diferentes espécies, sendo as mais frequentes *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas fragi* e *Listeria monocytogenes*.

A aspersão do ácido lático, independente da concentração utilizada, não reduziu a carga microbiológica deteriorante ou patogênica em carcaças de frango coletadas após o processo de abate em um frigorífico comercial e armazenadas por sete dias sob refrigeração.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Poultry Industry – background. 2017. Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/en/poultry-industry/background>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Relatório Anual, São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Acesso em 02 de setembro de 2018.

ADAMCIC, M.; CLARK, D.S. Bacteria induced biochemical changes in chicken skin stored at 5°C. *Journal of Food Science*, v.35, p. 103-106, 1970.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. MCCLURE, P. *Food Microbiology*, 4ed. Guildford : Royal Society of Chemistry, 2016. 562p.

ALALI, W.Q.; GAYDASHOV, R.; PETROVA, E. et al. Prevalence of Salmonella on retail chicken meat in Russian Federation. *Journal of Food Protection*, v. 75, n. 8, p. 1469-1473, 2012.

ALMEIDA, J. C.; PAULA, C. M. S.; SVOBODA, W. K. et al. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 34, n. 1, p. 97-106, 2013.

ALONSO-HERNANDO, A.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Behavior of co-inoculated pathogenic and spoilage bacteria on poultry following several decontamination treatments. *International Journal of Food Microbiology*, n. 159, p. 152-159, 2012.

ALONSO-HERNANDO, A.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R. Effect of various decontamination treatments against Gram-positive bacteria on chicken stored under differing conditions of temperature abuse. *Food Control*, n. 47, p. 71-76, 2015.

ANANG, D. M.; RUSUL, G.; BAKAR, J. et al. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4°C. *Food Control*, v. 18, p. 961-969, 2007.

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

ANDRADE, M. C. G. Avaliação da qualidade microbiológica de carnes de peito de frangos de corte submetidas a diferentes temperaturas do ambiente de processamento. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANTUNEZ, H. C. S.; COSTA, C. S.; SILVA, W. P. et al. Efeito do ácido láctico e da radiação gama na eliminação de *Pseudomonas* spp. e na produção de amônia em peito de frango desossado resfriado. *Alimento e Nutrição*, v.17, n. 4, p. 367-372, 2006.

AOAC Official method 998.08. Confirmed *Escherichia coli* counts in Poultry, meats and Seafood (Petri-film Method). *Journal AOAC International*, v. 17, p. 64, 65, 2002.

American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of dairy products - microbiological and chemical. 10ed. New York : APHA, 1953. 369p.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, v.2, p. 1751-1773, 2010.

ARNAUT-ROLLIER, I.; ZUTTER, L.; HOOF, J. V. Identities of the *Pseudomonas* spp. in flora from chilled chicken. *International Journal of Food Microbiology*, v. 48, p. 87-96, 1999.

BAIRD, R. M.; LEE, W. H. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 26, p. 15-24, 1995.

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

BARNES, E. M.; THORNLEY, M. J. The spoilage flora of eviscerated chickens stored at different temperatures. *Journal Food Technology*, v. 1, p.113-119, 1966.

BATZ, M. B.; HOFFMANN, S.; MORRIS, J. G. Ranking the disease burden of 14 pathogens in food sources in the United States using attribution data from outbreak investigations and expert elicitation. *Journal of Food Protection*, v. 75, n. 7, p. 1278–1291, 2012.

BAUTISTA, L.; GAYA, P.; MEDINA, M.; NUNEZ, M. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 566-569, 1988.

BAILEY, S.; RICHARDSON, L. J.; COX, N. A. et al. *Salmonella*. In: JUNEJA, V. K.; SOFOS, J. N. EDS. Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions, c. 7, p. 108-118, Washington, DC: ASM Press, 2010.

BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações de ácidos orgânicos na produção de aves de corte. Conferência AVESUI, 2004, Florianópolis, SC. Anais eletrônicos... Concórdia: Embrapa CNPSA, 2004, p. 1-16. Disponível em: < [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/publicacao\\_h6n45p3z.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_h6n45p3z.pdf)> Acessado em: 04 de agosto de 2016.

BENEDICT, R. C. Microbial attachment to meat surfaces. *American Meat Science Association*, v. 41, p. 1-6, 1988.

BENNETT, S. D.; WALSH, K. A.; GOULD, L. H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* – United States, 1998–2008. *Clinical Infectious Diseases*, v. 57, n. 3, p.425–433, .2013.

BIN KINGOMBEA, C. I.; HUYSB, G.; HOWALDA, D. et al. The usefulness of molecular techniques to assess the presence of *Aeromonas* spp. harboring virulence markers in foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 113 – 121, 2004.

BÖHME, K.; ANTELO, S. C.; FERNÁNDEZ-NO, I. C. et al. Detection of foodborne pathogens using MALDI-TOF Mass Spectrometry. In.: VELAZQUEZ, J. B. (Ed.) *Antimicrobial Food Packaging*, USA:Elsevier Inc., 2016, Cap. 15, p. 203-214.

BOLDER, N. M. Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science & Technology*, v. 8, p. 221-227, 1997.

BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P. et al. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. *Ciência Rural*, v. 40, n. 11, p. 2338-2342, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF. 171p. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016. Programa de redução de patógenos – Monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos e perus, 2016. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 78, de 3 de novembro de 2003. Normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e livres ou controlados para *Salmonella* Enteritidis e para *Salmonella Typhimurium*. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria n. 210 - 10 nov. 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº9, de 8 de abril de 2009. Procedimentos de controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2017/2018 a 2027/2028, 7 ed. Brasília, 2018a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola>>. Acesso em 02 de setembro de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, Brasília, junho de 2018b, 16p. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>>. Acesso em 05 de dezembro de 2018.



BRASIL. Resolução DIPOA nº 4, de 4 de outubro de 2011. Autoriza o emprego do sistema de lavagem de carcaças no abate de aves. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Seção 1, nº 206, p.3. Brasília, DF, 2011.

BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J. et al. Salmonella nomenclature. Journal of Clinical Microbiology, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BRINK, A. J.; VAN STRATEN, A.; VAN RENSBURG, A. J. Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens bacteremia. Clinical Infections Disease, v. 20, p. 1327-1332, 1995.

BUCHANAN, R.; GORRIS, L. G. M.; HAYMAN, M. M. et al. A review of Listeria monocytogenes: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food Control, v. 75, p. 1-13, 2017.

BUERIS, V.; MOREIRA, C. G.; SANTOS, K. R. N. et al. Staphylococcus epidermidis e outras espécies de Staphylococcus, Micrococcus e Rothia (Stomatococcus). TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Eds). Microbiologia. 4ed. São Paulo : Atheneu, 2004. In: Cap. 21, p. 183-187.

BUNCIC, S.; SOFOS, J. Interventions to control Salmonella contamination during poultry, cattle and pig slaughter. Food Research International, v. 45, p. 641-655, 2012.

BURFOOT, D.; MULVEY, E. Reducing microbial counts on chicken and turkey carcasses using lactic acid. Food Control, v. 22, p. 1729-1735, 2011.

BUXTON, A. Salmonellosis in animals: a review. Review series No. 5 of the Commonwealth Bureau of Animal Health. Buckinghamshire: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1957. 222p.

BUYSER, M. L.; AUDINET, N.; BELBART, M. O. et al. Comparison of selective culture media to enumerate coagulase-positive staphylococci in cheeses made from raw milk. Food Microbiology, v. 15, p. 339-346, 1998.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A. et al. Sequenciamento de peptídeos usando Espectrometria de Massas: Um Guia Prático. Química Nova, v.31, n.3, p. 669-675, 2008.

CARBONNELLE, E.; BERETTI, J. L; COTTYN, S. et al. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Journal of Clinical Microbiology, v. 45, p. 2156-2161, 2007.

CARPENTER, C. E.; SMITH, J. V.; BROADBENT, J. R. Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. Meat Science, v. 88; p. 256-260, 2011.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em 30 de janeiro de 2018.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Diarrheagenic Escherichia coli - technical information. 2014a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/diarrheagenic-ecoli.html>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Escherichia coli enterotoxigênica - frequently asked questions. 2014b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/etec.html>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Escherichia coli* - general information. 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet). 2017a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodnetfast/>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Listeria* - listeriosis. 2017b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/faq.html>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.

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

CHEN, Y. S.; LIU, Y. C.; YEN, M. Y. et al. Skin and soft-tissue manifestations of *Shewanella putrefaciens* infection. *Clinical Infection Disease*, v. 25, n. 2, p. 225-229, 1997.

CINTRA, A. P. R.; ANDRADE, M. C. G.; LAZARINI, M. M. et al. Influence of cutting room temperature on the microbiological quality of chicken breast meat. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, n. 3, p. 814-820, 2016.

CLAYTON, E. M.; DALY, K. M.; GUINANE, C. M. et al. Atypical *Listeria innocua* strains possess an intact LIPI-3. *Biomed Central Microbiology*, v. 14, n.58, p. 1-9, 2014.

CORNU, M.; BILLIR, E.; BERGIS, H. et al. Modeling microbial competition in food: application to the behavior of *Listeria monocytogenes* and lactic acid flora in pork meat products. *Food Microbiology*, n. 28, p. 639-647, 2011.

COSANSU, S.; AYHAN, K. Effects of lactic and acetic acid on survival of *Salmonella enteritidis* during refrigerated and frozen storage of chicken meats. *Food Bioprocess Technology*, v. 5, p. 372-377, 2012.

COSSI, M. V. C.; ALMEIDA, M. V.; DIAS, M. R. et al. Inspected and non-inspected chilled chicken carcasses commercialized in Viçosa, MG, Brazil: microbiological parameters and *Salmonella* spp. occurrence. *Ciência Rural*, v. 42, n.9, p. 1675-1681, 2012.

COSTA, F. N.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouros de frangos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, n, 5, 2002.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. APHA. Psychrotrophic microorganisms. In: DOWENSM F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4ed., c. 13, p. 159-164. Washington: American Public Health Association (APHA), 676p, 2001.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Federation of European Microbiological Societies*, v. 36, p. 380-407, 2012.

CROWE, S. J.; MAHON B. E.; VIEIRA, A. R. et al. Vital signs: multistate foodborne outbreaks – United States, 2010-2014. *Centers for Disease Control and Prevention*, v. 64, n. 43, p. 1221-1225, 2015.

CUNHA, M. L. R. S.; PERESI E.; CALSOLARI, A. O.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 70-74, 2006a.

CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. Espectrometria de massa de proteína – O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*. ano IX, n.36, 2006b.

CURIALE, M. S.; SONS, T.; McIVER, D. Dry rehydratable film for enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* in foods: Collaborative study. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, v. 74, p. 635-648, 1991.

DALLAGASSA, C. B.; HUERGO, L. F.; STETS, M. I. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry analysis of *Escherichia coli* categories. *Genetics and Molecular Research*, v.13, n.1, p.716-722, 2014.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, v. 17, n. 6, p. 474-483, 2006.

DAUD, H. B.; McMEEKIN, T. A.; THOMAS, C. J. Spoilage association of chicken skin. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 399-401, 1979.

DAVID, D. J. V.; COSSART, P. Recent advances in understanding *Listeria monocytogenes* infection: the importance of subcellular and physiological context. *Faculty of 1000 Research*, n. 6, p. 1-9, 2017.

DEC, M.; PUCHALSKI, A.; URBAN-CHMIEL, R. et al. 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BioMed Central Microbiology*, v. 16, n. 105, p. 1-16, 2016.

DE NOORDHOUT, M.C.; DEVLEESSCHAUWER, B.; ANGULO, F.J. et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, p. 1-11, 2014.

DEVLIEGHERE, F.; LEFEVERE, I.; MAGNIN, A. et al. Growth of *Aeromonas hydrophila* in modified-atmosphere packed cooked meat products. *Food Microbiology*, v. 17, p. 185 – 196, 2000.

DIECKMANN, R; MALORNY, B. Rapid Screening of Epidemiologically Important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, v.77, n.12, p.4136–4146, 2011.

DOAN N, T. L.; VAN HOORDE, K.; CNOCKAERT, M. et al. Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Letters in Applied Microbiology*, v.55, n.4, p.265–273, 2012.

DRIGO, L. C. Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Determinação de Anti-Hipertensivos em Amostras de Estudos de Permeação em Células CACO-2 Utilizando Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa. 2013. 84f. Dissertação (Mestre em Química Analítica) – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

DUAN, D.; WANG, H.; XUE, S. et al. Application of disinfectant sprays after chilling to reduce the initial microbial load and extend the shelf-life of chilled chicken carcasses. *Food Control*, n. 75, p. 70-77, 2017.

DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M. et al. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 569-573, 2009.

DUŠKOVÁ, M.; ŠEDO, O.; KŠICOVÁ, K. et al. Identification of Lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. *International Journal of Food Microbiology*. v.159, p.107–114, 2012.

European Commission (EC). Commission Regulation No 101/2013 of 4 February 2013 concerning the use of lactic acid to reduce microbiological surface contamination on bovine carcasses. *Official Journal of the European Union*, p. 1-3, 2013.

European Commission (EC). Commission Regulation No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, p. 1–26, 2005

European Food Safety Authority (EFSA). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *European Food Safety Authority Journal*, v.10, 232p. 2016. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4634/full>>. Acesso em 04 de setembro de 2017.

EUZÉBY, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em 11 de dezembro de 2018.

EVANS, D. J.; EVANS, D. G. *Escherichia coli* in diarrheal disease. In: BARON, S.(Ed.). *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Cap. 25. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035>>. Acesso em: 21 de setembro de 2017.

FAVARO, M.; SARMATI, L.; SANCESARIO, G.; FONTANA, C. First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etanercept. *Journal of Medical Microbiology*, P. 1-5, 2014.

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO/WHO). Microbiological risk assessment series 5: Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods - Technical report. Itália, 2004. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/y5394e/y5394e.pdf>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets. Itália, November 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em 02 de dezembro de 2018.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Guidelines for slaughtering, meat cutting and further processing. Roma, 1991. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/004/T0279E/T0279E00.htm#TOC>>. Acesso em 02 de setembro de 2018.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Poultry development review. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/019/i3531e/i3531e.pdf>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.

FAÚLA, L. L. Fatores de virulência, sorotipos e susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de alimentos no estado de Minas Gerais, Brasil. 2016. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG.

FAÚLA, L.L.; SOARES, A.C.C; DIAS, R.S. Panorama dos Surtos de Doenças de Transmissão Alimentar, ocorridos em Minas Gerais, Brasil, no período de 2010 a 2014. *Gerais: Revista de Saúde Pública do SUS/MG*, v.3, n.1, p. 84-94, 2015.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R. et al. *Salmonella* serovars isolated from human in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, n.4, p. 179-184, 2006.

- FIRSTENBERG-EDEN, R. J. Attachment of bacteria to meat surfaces: A review. *Journal of Food Protection*, v. 44, n. 8, p.602-607, 1981.
- FLETCHER, M.; FLOODGATE, G. D. An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *Journal of General Microbiology*, v.74, p. 325-334, 1973.
- FOOKES, M.; SCHROEDER, G. N.; LANGRIDGE, G.C. et al. *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the *Salmonellae*. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 8, 2011.
- FORIS, L. A.; SNOWDEN, J. *Proteus mirabilis* infections. StatPearls Publishing LLC. 2017. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/>>. Acesso em: 30 de novembro de 2017.
- FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607p.
- FOSTER, T. *Staphylococcus*. In: BARON, S.(Ed.). *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Cap. 12. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035>>. Acesso em: 21 de setembro de 2017.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.
- FRAZIER, W. C. *Microbiologia de lós alimentos*. Zaragoza: Acribia, 681p, 1993.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS). *Chicken from farm to table*. 2015. Disponível em: <<https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/poultry-preparation/chicken-from-farm-to-table>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS). *Pathogen reduction; hazard analysis and critical control point (HACCP) systems; final rule*. *Federation Register*, n. 61, p.38806–38989, 1996.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS). *Safe and suitable ingredients used in the production of meat and poultry products*. Directive 7120.1, rev. 36, 2016. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/bab10e09-aefa-483b-8be8-809a1f051d4c/7120.1.pdf>>. Acesso em 31 de julho de 2016.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS). *Serotypes profile of Salmonella isolates from meat and poultry products January 1998 through December 2014*. 2017. Disponível em:<http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/poultry-preparation/chicken-from-farm-to-table>. Acesso em 03 de outubro de 2017.
- GAMBLE, G. R; BERRANG, M. E.; BUHR, R. J. et al. Neutralization of bactericidal activity related to antimicrobial carryover in broiler carcass rinse samples. *Journal of Food Protection*, v. 80, n. 4, p. 685-691, 2017.
- GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELO, W. S. M. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Scientiarum Technology*, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
- GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. *Taxonomic outline of the prokaryotes release 5.0 – Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. 2º ed., Springer: New York, 2004. 401 p.
- GENIGEORGIS, C.A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International Journal of Food Microbiology*, v. 9, p. 327-360, 1989.

GILLASPY, A. F.; IANDOLO, J. J. Staphylococcus. In.: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. (Eds) Encyclopedia of Food Microbiology. 2 ed. Ithaca: Elsevier Inc., 2014. Vol. 3, p. 482-507.

GIOMBELLI, A. Métodos de Análise e Mapeamento de Micro-organismos Patogênicos e Indicadores de Qualidade e Higiene na Criação e no Abate de Frangos. 2013. 166f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M. et al. Food spoilage - interactions between food spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology, v. 78, p. 79-97, 2002.

GRAVES, L. M.; HELSEL, L. O.; STEIGERWALT, A. G. et al. Listeria marthii sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 60, p. 1280-1288, 2010.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X.. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella (9th ed.): Institute Pasteur, Paris. 2007.

AAA, M. N. Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter and Proteus. In: BARON, S.(Ed.). Medical Microbiology. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Cap. 26. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035>>. Acesso em: 21 de setembro de 2017.

GUERREIRO, I.; TAYLOR, J. Meat surface decontamination using lactic acid from chemical and microbial sources. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologies, v. 27, p. 201-209, 1994

HAN, S. -K; HONG, Y.; KWAK, H. -L. et al. Identification of lactic acid bacteria in pork meat and pork meat products using SDS-PAGE, 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry. Journal of food safety. v.34, n.3, p.224-232, 2014.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 68, n. 4, p. 669-685, 2004.

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876p.

HATA, H.; NATORI, T.; MIZUNO, T. et al. Phylogenetics of family Enterobacteriaceae and proposal to reclassify Escherichia hermannii and Salmonella subterranea as Atlantibacter hermannii and Atlantibacter subterranea gen. nov., comb. nov. Microbiology and Immunology, v. 60, n. 5, p. 303-311, 2016.

HAYAMA, Y.; YAMAMOTO, T.; KASUGA, F. et al. Simulation model for Campylobacter cross-contamination during poultry processing at slaughterhouses. Zoonoses Public Health, v. 58, n. 6, p. 399-406, 2011.

HENNEKINNE, J-A.; BUYSER, M-L.; DRAGACCI, S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. Federation of European Microbiological Societies, v. 36, p. 815–836, 2012.

HINTON, A.; CASON, J. A. Bacterial flora of processed broiler chicken skin after successive washings in mixtures of potassium hydroxide and lauric acid. Journal of Food Protection, v. 71, n. 8, p. 1707–1713, 2008.

HINTON JR., A.; CASON, J. A.; INGRAM, K. D. Tracking spoilage bacteria in commercial poultry processing and refrigerated storage of poultry carcasses. International Journal of Food Microbiology, v. 91, p. 155– 165, 2004.

HUGAS, M.; TSIGARIDA, E. Pros and cons of carcass decontamination: the role of the European Food Safety Authority. *Meat Science*, v. 78, p. 43-52, 2008.

HÖLL, L.; BEHR, J.; VOGEL, R. F. Identification and growth dynamics of meat spoilage microorganisms in modified atmosphere packaged poultry meat by MALDI-TOF MS. *Food Microbiology*, v. 60, p. 84-91, 2016.

HRUŠKOVÁ, V. Foodborne *Staphylococcus aureus*: Identification and enterotoxin production in milk and cheese. 2012. 85 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade de Tecnologia de Brno, Brno, República Checa.

HWANG, C.; BEUCHAT, L. R. Efficacy of selected chemicals for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 1, p. 19-23, 1994.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). *Microorganisms in Foods. 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. 2ed, New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2005. 777p.

IGBINOSA, I. H.; IGUMBOR, E. U.; AGHDASI, F. Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 1-12, 2012.

IGLEWSKI, B. H. *Pseudomonas*. In: BARON, S.(Ed.). *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Cap. 27. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035>>. Acesso em: 21 de setembro de 2017.

International Organization for Standardization - iso 6579. *Microbiologia de alimentos e alimentação de animais - Método horizontal para a detecção de Salmonella spp.*, 4ª ed., 2002.

International Organization for Standardization - ISO 11290-1. *Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Métodos horizontais para detecção e enumeração de Listeria monocytogenes – Parte I: Método de detecção*, 1ª ed., 1996

International Organization for Standardization - iso 6888-1. *Microbiologia de alimentos e de produtos de alimentação animal – Métodos horizontais para enumeração de estafilococos coagulase-positivos (Staphylococcus aureus e outras espécies)*. Parte 1: Técnica usando meio ágar Baird-Parker, 1ª ed. 1999.

ISONHOOD, J. H.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. *Journal of Food Protection*, v. 65, n. 3, p. 575–582, 2002.

International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Analytical Division. *Compendium of Analytical Nomenclature (the “Orange Book”)*. Definitive Rules, 1979. Compiled by J. Inczédy, T. Lengyel, A. M. Ure. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Disponível em: <[http://media.iupac.org/publications/analytical\\_compendium/](http://media.iupac.org/publications/analytical_compendium/)>. Acesso em 16 de outubro de 2017.

JAMESON, J. A discussion of the dynamics of *Salmonella* enrichment. *Journal of Hygiene*, n. 60, p. 193-207, 1962.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, p. 332-344, 1998.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 23, p. 35-73, 2010.

- JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Histologia Básica – texto e atlas. 10ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 488 p
- KABUKI, D. Y. Contagem de *Listeria* spp pelo método do Número Mais Provável (NMP), avaliação da sua ocorrência em carnes de frango e da eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por *Listeria monocytogenes*. 1997. 103f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Campinas. Campinas, SP.
- KANELLOS, T. S.; BURRIEL, A. R. The in vitro bactericidal effects of the food decontaminants lactic acid and trisodium phosphate. *Food Microbiology*, v. 22, p. 591–594, 2005.
- JANG, K-I; KIM, M-G.; HA, S-D. et al. Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, n. 2, p. 202-206, 2007.
- KIM, K. Y.; FRANK, J. F.; CRAVEN, S. E. Three-dimensional visualization of *Salmonella* attachment to poultry skin using confocal scanning laser microscopy. *Letters in Applied Microbiology*, v. 22, p. 280-282, 1996.
- KOMESU, A.; OLIVEIRA, J. A. R.; MARTINS, L. H. S. et al. Lactic acid production to purification: A review. *Bio Resources*, v. 12, n. 2, p. 4364-4383, 2017.
- KOPPENAAL, D. W.; BARINAGA, C. J.; DENTON, M. B. et al. MS Detectors. *Analytical Chemistry*, v.77, n.21, p.418–427, 2005.
- LECLERC, H.; MOSSEL, D. A. A.; EDBERG, S. C. et al. Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety. *Annual Reviews Microbiology*, v. 55, p. 201-234, 2001.
- LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C. et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 60, p. 2210-2214, 2010.
- LECOMPTE, J. Y.; COLLIGNAN, A.; SARTER, S. et al. Decontamination of chicken skin surfaces inoculated with *Listeria innocua*, *Salmonella enteritidis* and *Campylobacter jejuni* by contact with a concentrated lactic acid solution. *British Poultry Science*, v. 50, n. 3, p. 307-317, 2009.
- LECOMPTE, J. Y.; KONDJOYAN, A.; SARTER, S. et al. Effects of steam and lactic acid treatments on inactivation of *Listeria innocua* surface-inoculated on chicken skins. *International Journal of Food Microbiology*, v. 127, p. 155-161, 2008.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LIMA, A. L. Prevalência de *E. coli* O157:H7 e linhagens produtoras de toxina do tipo Shiga em carcaças de frango de corte abatidas no estado de Minas Gerais. 2012. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- LIU, A.; PENG, Z.; ZOU, L. et al. The effects of lactic acid-based spray washing on bacterial profile and quality of chicken carcasses. *Food Control*, v. 60, p. 615-620, 2016.



- LORETZ, M.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: a literature survey. *Food Control*, v. 21, p. 791-804, 2010.
- LOW, J. C.; DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *The Veterinary Journal*, v. 153, p. 9-29, 1997.
- MAGA, J. A.; TU, A. T. (Eds.) *Food Additive Toxicology*. New York : Marcel Dekker Inc., 1994. 552p.
- MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, v. 45, p. 713-721, 2012.
- MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology*, v. 68, p. 337-348, 1971.
- MARTIN, N. H.; TRMČIĆ, A.; HSIEH, T. et al. The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. 1549, p. 1-8, 2016.
- MARTINS, A. G. L. A.; NASCIMENTO, A. R.; VIEIRA, R. H. S. F. et al. Quantificação e identificação de *Aeromonas* spp. em águas de superfície do estuário do rio Bacanga em São Luís / MA (Brasil). *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v.27, p. 107-118, 2009.
- MARTINS, P. D.; ALMEIDA, T. T.; BASSO, A. P. et al. Coagulase-Positive Staphylococci Isolated from Chicken Meat: Pathogenic Potential and Vancomycin Resistance. *Foodborne Pathogens and Disease*, v.10, n.9, p.771 -776, 2013.
- MAZZEO, M. F.; SORRENTINO, A.; GAITA, M. et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for the Discrimination of Food-Borne Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.2, p.1180–1189, 2006.
- MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 92, p. 15-33, 2004.
- MCMEEKIN, T. A.; THOMAS, C. J. Retention of bacteria on chicken skin after immersion in bacterial suspensions. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 45, p. 383-387, 1978.
- MEAD, G.C. Fresh and further-processed poultry. In.: LUND, B.M., BAIRD–PARKER, T.C., GOULD, G.W. (Eds.). *The microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg: Aspen Publishers Inc., 2000. Vol. 1, Cap. 20, p. 445–471.
- MEAD, G. C. Microbiological quality of poultry meat: a review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 6, n.3, p. 135-142, 2004.
- MELLOR, G.E.; BENTLEY, J.A.; DYKES, G.A. Evidence for a role of biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* in the spoilage of fresh aerobically stored chicken meat. *Food Microbiology*, v. 28, p. 1101-1104, 2011.
- MENEZES, L. D. M. Caracterização microbiológica de ovos de consumo e de carcaças de frango produzidos no estado de Minas Gerais. 2013. 103f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- MIKOLAJCZYK, A. Evaluation of the effects of a mixture of organic acids and duration of storage on the survival of salmonella on turkey carcasses. *Journal Food Protection*, v. 78, n. 3, p. 585-589, 2015.

- MOORE, J. L.; CAPRIOLI, R. M.; SKAAR, E. P. Advanced Mass Spectrometry Technologies for the Study of Microbial Pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*, v.19, p.45-51, 2014.
- MORAES, C. S.; JUNIOR, F. O. R. O.; MASSON, G et al. Série em Biologia Celular e Molecular - Métodos Experimentais no Estudo de Proteínas. Rio de Janeiro: IOC. 2013. 84p.
- MOROBÉ, I.C.; OBI, C.L.; NYILA, M.A. et al. Molecular Characterization and serotyping of *Listeria monocytogenes* with a focus on food safety and disease prevention. In.: JIMENEZ-LOPEZ, J. C. (Ed.). *Biochemical Testing*. Croatia: InTech Open, 2012. Vol. 1, Cap. 8, p. 197-216. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biochemical-testing/molecular-characterization-and-serotyping-of-listeriamonocytogenes-isolates-from-various-foods-in-g>>. Acesso em: 04 de janeiro de 2018.
- MUJAHID, S., PECHAN, T., WANG, C. Protein Expression by *Listeria monocytogenes* Grown on a RTE-meat Matrix. *International Journal of Food Microbiology*, v.128, p.203–211, 2008.
- MULDER, R.W.A.W. Hygiene during transport, slaughter and processing. In: RICHARDSON, R.I.; MEAD, G.C. (Eds.). *Poultry Meat Science: Poultry Science Symposium Series*. Massachusetts: CABI International, 1999. Vol. 25, Cap. 12, p. 277–283.
- MYKYTCZUK, N.C.S.; TREVORS, J.T.; LEDUC, L.G.; FERRONI, G.D. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v.95, p.60–82. 2007.
- NAGASE, N.; SASAKI, A.; YAMASHITA, K. et al. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 64, n. 3, p. 245-250, 2002.
- NALÉRIO, E. S.; ARAÚJO, M. R.; MENDONÇA, K. S. et al. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.. 29, n. 3, p. 626-630, 2009.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- NEYTS, K.; HUYS, G.; UYTENDAELE, M. et al. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. *Letters in Applied Microbiology*, v. 31, n. 5, p. 359–363, 2000.
- NISA, S.; SCANLON, K. M. DONNENBERG, M. Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: producing *Escherichia coli*. In: DONNENBERG, M. S. (Ed.) *Escherichia coli – Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. 2 ed. Baltimore: Elsevier Inc., 2013. Cap. 4, p. 75-119
- NOMURA, F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1854, p. 528-537, 2015.
- NØRRUNG, B.; BUNCIC, S. Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science*, v. 78, n. 1, p. 14-24, 2008.
- NOTERMANS, S.; DORMANS, J. A. M. A.; MEAD, G. C. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: A review. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, v. 5, p. 21-36, 1991.
- NOTERMANS, S.; KAMPELMACHER, E. H. Attachment of some bacterial strains to the skin of broiler chickens. *British Poultry Science*, v.15, p. 573-585, 1974.

- OAKLEY, B. B.; MORALES, C. A.; LINE, J. et al. The poultry-associated microbiome: network analysis and farm-to-fork characterizations. *Public Library of Science*, vol. 8, n. 2, p. 1-12, 2013.
- OKOLOCHA, E. C.; ELLERBROEK, L. The influence of acid and alkaline treatments on pathogens and the shelf life of poultry meat. *Food Control*, v. 16, p. 217-225, 2005.
- OMS. Organização Mundial da Saúde. Guidelines for drinking-water quality. 4º ed. Malta : World Health Organization, 2011, 564 p.
- ÖZEN, A. I.; USSERY, D. W. Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*? *Microbial Ecology*, v. 63, n. 2, p. 239-248, 2011.
- PAINTER, J. A.; HOEKSTRA, R. M.; AYERS, T. et al. Hospitalizations, and deaths to food commodities by using outbreak data, United States, 1998-2008. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n.3, p. 407-415, 2013.
- PAIVA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. Introdução à Espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
- PALLERONI, N. J. Introduction to the family Pseudomonadaceae. In: Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H. G. et al (Eds). *The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. Nova York : Springer Science & Business Media, 2013. V. 1, cap. 58, p. 655-665.
- PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A. et al. Enterobacteriaceae, coliforms and *E. coli* - Introduction. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. (Eds) *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2 ed. Ithaca: Elsevier Inc., 2014. Vol. 1, p. 659-666.
- PATIJANASOONTORN, B.; BOONMA, P.; WILAILACKANA, C. et al. Hospital acquired *Janthinobacterium lividum* septicemia in Srinagarind Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand*, v. 12, p. 6-10, 2000.
- PAVLOVIC, M.; HUBER, I.; KONRAD, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for the Identification of Food Borne Bacteria. *The Open Microbiology Journal*, v.7, p.135–141, 2013.
- PENTEADO, F.R.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa – Paraná. *Biology Health Science*, v.17, n.1, p.37-45, 2011.
- PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M. et al. *Aeromonas* spp. e *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*Perna perna*) in natura e pré-cozidos no Rio de Janeiro, RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, 2004.
- PERRIN M, BEMER M, DELAMARE C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n.11, p. 5308–5309, 2003.
- PHILLIPS, C. I.; BOGYO, M. Proteomics meets microbiology: technical advances in the global mapping of protein expression and function. *Cellular Microbiology*, v. 7, n. 8, p. 1061-1076, 2005.
- PICARIELLO, G.; MAMONE, G.; ADDEO, F. et al. Novel mass spectrometry-based applications of the ‘Omics’ sciences in food technology and biotechnology. *Food Technology and Biotechnology*, v. 50, n. 3, p. 286-305, 2012.
- REITER, M. G. R.; BUENO, C. M. M.; LÓPEZ, C. et al. Occurrence of *Campylobacter* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing plant. *Journal of Food Protection*, v. 68, p. 1903-1906, 2005.

ROASTO, M.; HÖRMAN, A.; HÄNNINEN, M. Food-borne pathogens and public health. In.: Food Safety and Public Health, cap. 34, p. 271-282, 2012.

RODRÍGUEZ-MELCÓN, C.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R. Lactic acid concentrations that reduce microbial load yet minimally impact colour and sensory characteristics of beef. *Meat Science*, v. 129, p. 169-175, 2017.

ROSSOLINI, G. M.; CONDEMI, M. A.; PANTANELLA, F. et al. Metallo- $\beta$ -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 3, p. 837-844, 2001.

ROUGER, A.; TRESSE, O.; ZAGOREC, M. Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species and dynamics. *Microorganisms*, v. 5, n. 50, p. 1-16, 2017.

RUSSELL, S. M.; FLETCHER, D. L.; COX, N. A. Spoilage bacteria of fresh broiler chicken carcasses. *Poultry Science*, v. 75, p. 2041-2047, 1996.

RUSSELL, S. M. Spoilage bacteria associated with poultry. In: SAMS, A. R. (Ed.) *Poultry Meat Pressing*. Boca Raton : Taylor & Francis Group, 2001. Cap. 10, p. 159-179.

SÄDE, E.; MURROS, A.; BJÖRKROTH, J. Predominant enterobacteria on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food Microbiology*, n. 34, p. 252-258, 2013.

SAKHARE, P. Z.; SACHINDRA, N. M.; YASHODA, K. P. et al. Efficacy of intermittent decontamination treatments during processing in reducing the microbial load on broiler chicken carcass. *Food Control*, v. 10, p. 189-194, 1999.

SAUER, S.; KLIEM, M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews*, v. 8, p. 74-82, 2010.

SAVINI, V.; PASSERI, C.; MANCINI, G. et al. Coagulase-positive staphylococci: my pet's two faces. *Research in Microbiology*, v. 164, p. 371-374, 2013.

SCHELIN, J.; WALLIN-CARLQUIST, N.; COHN, M. T. et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. *Virulence*, v. 2, n. 6, p. 580-592, 2011.

SHARMA, K. K.; KALAWAT, U. Emerging infections: *Shewanella* – a series of five cases. *Journal of Laboratory Physicians*, v. 2, n. 2, p. 61-65, 2010.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R. et al. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 5, p. 2959-2965, 2004.

SIMAS, V. S.; SANTOS, F. F.; GOUVÊA, R. et al. Pré-resfriamento na redução de coliformes em carcaças de frango de corte. *Ciência Rural*, v. 43, n. 9, p. 1618-1622, 2013.

SINGHAL, N.; KUMAR, M. KANAUIA, P. K. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. 791, p. 1-16, 2015.

SINHAMAHPATRA, M.; BISWAS, S.; DAS, A. K. et al. Comparative study of different surface decontaminants on chicken quality. *British Poultry Science*, v. 45, n. 5, p. 624-630, 2004.

- SIRIKEN, B.; TÜRK, H.; YILDIRIM, T. et al. Prevalence and characterization of Salmonella isolated from chicken meat in Turkey. *Journal of Food Science*, v. 80, n. 5, p. 1044-1050, 2015.
- SKRIVANOVÁ, E.; MOLATOVÁ, Z.; MATENOVÁ, M. et al. Inhibitory effect of organic acids on arcobacters in culture and their use for control of *Arcobacter butzleri* on chicken skin. *International Journal of Food Microbiology*, v. 144, n. 3, p. 367-371, 2011.
- SMIGIC, N.; RAJKOVIC, A.; NIELSEN, D. S. et al. Survival of lactic acid and chlorine dioxide treated *Campylobacter jejuni* under suboptimal conditions of pH, temperature and modified atmosphere. *International Journal of Food Microbiology*, v. 141, p. 5140-5146, 2010.
- SMULDERS, F. J. M.; GREER, G. G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*, v. 44, p. 149-169, 1998.
- SNIJDERS, J. M. A.; VAN LOGTESTIJN, J. G.; MOSSEL, D. A. A. et al. Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *The Veterinary Quarterly*, v. 7, n.4, p. 277-282, 1985.
- SOGAWA, K.; WATANABE, M.; SATO, K. et al. Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v.400, n.7, p.1905-1911, 2011.
- SU, Y. C.; WONG, A.C.L. Current Perspectives on Detection of Staphylococcal Enterotoxins. *Journal of Food Protection*, v.60, n.2, p.195-202, 1997.
- THAM, W.; HAJDU, L.J. A comparison of six media for isolation of *Staphylococcus aureus* from foods. *Food Microbiology*, v. 4, p. 133-146, 1987.
- THOMAS, C. J.; MCMEEKIN, T. A. Contamination of broiler carcass skin during commercial processing procedures: an electron microscopic study. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 133-144, 1980.
- TOLDRÁ, F.; SANZ, Y.; FLORES, M. Meat Fermentation Technology. In: HUI, Y. H.; NIP, W. K.; ROGERS, R. W. et al. (Eds.). *Meat Science and Applications*. New York: Marcel Dekker Inc., 2001. chap. 23, p. 537-563.
- TRABULSI, L. R.; TEIXEIRA, L. M.; BUERIS, V. *Staphylococcus aureus*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Eds). *Microbiologia*. 4ed. São Paulo : Atheneu, 2004. Cap. 20, p. 175-182.
- União Brasileira de Avicultura (UBABEF). A saga da avicultura brasileira – como o Brasil se tornou o maior exportador mundial de carne de frango. 2011. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/informes-especiais>>. Acesso em 18 de setembro de 2017.
- VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; LYKLEMA, J.; NORDS, W. et al. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, n. 8, p. 1893-1987, 1987.
- VASCONCELOS, N. G.; PEREIRA, V. C.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. et al. Molecular detection of enterotoxins E, G, H, and I in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples of newborns in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, v. 111, n. 3, p. 749-762, 2011.
- VERAS, J. F.; CARMO, L. S.; TONG, L. C. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 12, n. 4, p. 410-415, 2008.

WANG, G.; WANG, H.; HAN, Y. et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from chilled chicken in vitro and in situ. *Food Microbiology*, v. 53, p. 139-145, 2017.

WIEDMANN, M.; BARANY, F.; BATT, C.A. Detection of *Listeria monocytogenes* with a Nonisotopic Polymerase Chain Reaction-Coupled Ligase Chain Reaction Assay. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, n.8, p. 2743-2745, 1993.

WIENEKE, A. A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R. J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiological Infection*, v. 110, p. 519-531, 1993.

World Health Organization (WHO). Food safety - Fact sheets n° 399, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. Acesso em 15 de abril de 2016.

YANG, Z.; LI, Y.; SLAVIK, M. F. Use of antimicrobial spray applied with an inside outside bird washer to reduce bacterial contamination on pre chilled chicken carcasses. *Journal of Food Protection*, v. 61, p.829-832. 1998.

ZAKI, H. M. B. A.; MOHAMED, H. M. H.; EL-SHERIF, A. M. A. Improving the antimicrobial efficacy of organic acids against *Salmonella enterica* attached to chicken skin using SDS with acceptable sensory quality. *Food Science and Technology*, v. 64, p. 558-564, 2015.

ZEITOUN, A.A.M.; DEBEVERE, J.M. Decontamination with Lactic Acid/Sodium Lactate Buffer In Combination with Modified Atmosphere Packaging Effects on the Shelf Life of Fresh. *Food Microbiology*, v. 16, p. 89-98. 1992.

ZHU, Y.; XIA, X.; LIU, A. et al. Effects of combined organic acid treatments during the cutting process on the natural microflora and quality of chicken drumsticks. *Food Control*, v.67, p. 1-8, 2016.