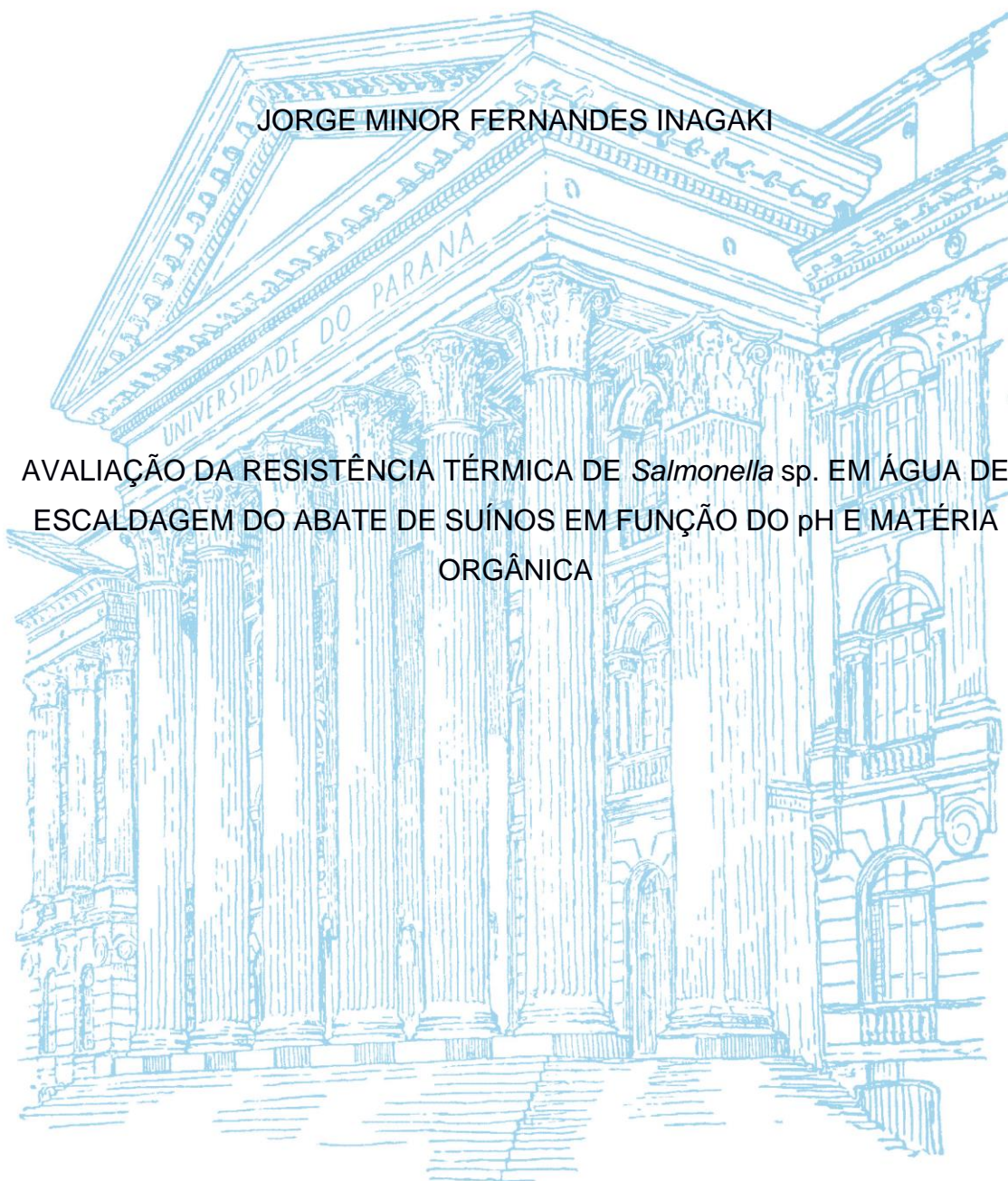


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JORGE MINOR FERNANDES INAGAKI

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Salmonella* sp. EM ÁGUA DE
ESCALDAGEM DO ABATE DE SUÍNOS EM FUNÇÃO DO pH E MATÉRIA
ORGÂNICA



PALOTINA

2015

JORGE MINOR FERNANDES INAGAKI

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *Salmonella* sp. EM ÁGUA DE
ESCALDAGEM DO ABATE DE SUÍNOS EM FUNÇÃO DO pH E MATÉRIA
ORGÂNICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

I35 Inagaki, Jorge Minor Fernandes
Avaliação da resistência térmica de *Salmonella* sp.
em água de escaldagem do abate de suínos em função do
ph e matéria orgânica / Jorge Minor Fernandes
Inagaki - Palotina, 2015.
67p.

Orientador: Luciano dos Santos Bersot
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal.

1. Escaldagem . 2. Resistência. 3. *Salmonella*.
I. Bersot, Luciano dos Santos . II. Universidade
Federal do Paraná.

CDU 636.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIA ANIMAL
Código CAPES: 40001016077P6

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JORGE MINOR FERNANDES INAGAKI**, intitulada: "**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE Salmonella sp. EM ÁGUA DE ESCALDAGEM DO ABATE DE SUÍNOS EM FUNÇÃO DO pH E MATÉRIA ORGÂNICA**", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO**, completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Mestre em CIÊNCIA ANIMAL**.

Palotina, 30 de Setembro de 2015.

Prof LUCIANO DOS SANTOS BERSOT
(Presidente da Banca Examinadora)

Prof LUIS AUGUSTO NERO

Prof FRANCESCA SILVA DIAS NOBRE

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jorge Minor Fernandes Inagaki, filho de Paulo Minor Inagaki e Soely Fernandes Inagaki, nascido em Cianorte, estado do Paraná, na data de 26 de março de 1989. Médico Veterinário, graduado pela Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina em 2012.

"Tudo é loucura ou sonho no começo, nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira. Mas já tantos sonhos se realizaram que não temos direito de duvidar de nenhum".
Monteiro Lobato

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, pelo ensino oferecido desde a graduação e agora com o Mestrado em Ciência Animal.

Agradeço também ao Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Alimentos e Água – LACOMA, que ofereceu toda a estrutura necessária para elaboração da pesquisa. E ao LABIOTEC pelo empréstimo de materiais e equipamentos para a realização dos experimentos.

Ao professor Dr. Luciano dos Santos Bersot, pela orientação, pela amizade, por todo o conhecimento e apoio oferecido.

Aos meus amigos do LACOMA, Cibeli, Rosana, Kamila, Camila, Nelson, Ane, Ana Paula, Rosangela, Kadigia e André que direta e indiretamente me auxiliaram durante este período.

Agradeço especialmente a Mallú por toda ajuda prestada tanto com a metodologia como na execução do experimento e a Mykaella que também dedicou suas horas auxiliando no experimento. Obrigado a ambas pela paciência, prontidão e dedicação imensurável que foi essencial para o sucesso deste projeto.

À Eliane e ao Airton por permitir a realização das coletas necessárias para a pesquisa e à Luciana por toda a ajuda prestada. Obrigado por me receberem com vocês e pelos ensinamentos essenciais para minha formação profissional, científica e pessoal.

Ao TECPAR, pelo apoio permitindo a continuidade e conclusão do mestrado, em especial ao Antonio e à Marta pela compreensão durante as ausências e também à Patrícia e ao Gilberto pelas orientações sobre a análise estatística e ajuda durante a elaboração desta dissertação.

Aos meus amigos de república Jhonathan e Thiago que me acolheram, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos demais amigos de Palotina e aos professores, graduandos e mestrandos que compartilharam seus conhecimentos e pelos momentos de alegria e confraternizações.

À Arielle pelo apoio incondicional, estando ao meu lado nos bons momentos e durante as dificuldades, me motivando, oferecendo seu carinho, amor e compreensão.

À minha família, meu porto seguro, que não mediu esforços para que meu sonho fosse realizado, estando sempre de prontidão pra me ajudar.

E por fim, à Deus, pela proteção, saúde e por ouvir e atender minhas orações e me guiar frente a todos os desafios.

RESUMO

A escaldagem é uma das principais etapas do abate de suínos com o objetivo de reduzir grandes quantidades de micro-organismos patogênicos, como a *Salmonella*. Conhecer os fatores que afetam a sobrevivência da *Salmonella* na escaldagem é essencial para garantir a menor passagem deste micro-organismo para as etapas posteriores de abate. O objetivo desta dissertação foi avaliar a resistência térmica de *Salmonella* Typhimurium e Derby em condições similares à escaldagem de abate de suínos e com diferentes pH e concentrações de matéria-orgânica. Amostras de água de escaldagem foram coletadas antes do início, no meio e ao final do abate de um matadouro frigorífico. Foram realizadas análises físico-químicas para quantificação de matéria-orgânica, cloro, turbidez e pH. O pH das amostras foi ajustado em 4, 7 e 10 e divididas em tubos de ensaio para os testes de letalidade térmica que foram realizados em banho-maria a 62°C por 5 minutos. Houve elevação constante na concentração de matéria-orgânica durante o abate. Não foi observada diferença no tempo de redução decimal (valor-D) entre as concentrações de matéria orgânica. Em pH alcalino *Salmonella* foi mais sensível com valor-D cerca de 17% menor que em neutro. O sorotipo Derby foi mais resistente que o Typhimurium inicialmente, porém, no final de cinco minutos foram equivalentes. Houve uma redução média de aproximadamente 3,19 log UFC/mL de *Salmonella* e valor-D de 1,65 minutos. Conclui-se que a adoção de escaldagem com temperatura de 62°C por 5 minutos é eficaz, e a definição do parâmetro de renovação de água não foi relevante para melhorar a eficiência na eliminação de *Salmonella*.

Palavras-chave: cal, calor, escaldagem, resistência, *Salmonella*

ABSTRACT

The scalding is one the main steps of swine slaughtering in order to reduce great quantities of pathogenic microorganisms, like *Salmonella*. To know the factors that affect the *Salmonella* survival in scalding is essential to guarantee the smallest passage of this microorganism to further slaughtering steps. This paper's objective was to avail the thermic resistance of the *Salmonella* Typhimurium and Derby in similar condition to scalding of swine slaughtering and with different pH levels and organic matter concentration. Samples of scalding water were collected before the beginning, in the middle, and at the end of the slaughter in a slaughterhouse. Physicochemical analyses were made to quantify the organic matter, chlorine, turbidity and pH. The sample's pH was adjusted to 4, 7, 10 and divided test-tubes to thermic lethality tests that were made in water-bath at 62°C for 5 minutes. There was constant rising in the organic matter concentration during the slaughter. It was not observed difference in the decimal reduction time (D-value) in the different levels of organic matter concentrations during the slaughter. In alkaline pH *Salmonella* was more sensible with approximately 17% lower D-value than when in neutral pH level. The serotype Derby was initially more resistant than the Typhimurium, however, by 5 minutes they were equivalent. There was an average reduction of approximately 3.19 log CFU/mL of *Salmonella* and D-value of 1.65 minutes. It was concluded that the adoption of scalding in temperatures of 62°C by 5 minutes is effective, and the definition of the water renovation parameter was not relevant to enhance the *Salmonella* elimination efficiency.

Keywords: lime, heat, scalding, resistance, *Salmonella*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Exemplificação de amostras de água de tanque de escaldagem, sendo (A) início; (B) 2 horas de processamento e (C) 3 horas de processamento45
- Figura 2 – Efeitos das contagens médias de *Salmonella* em relação às variações de cada fator pesquisado.48
- Figura 3 – Contagens medianas de *S. Derby* (SD) e *S. Typhimurium* (ST) em água de escaldagem a 62°C com diferentes variações de pH e matéria orgânica em relação ao tempo em minutos.49
- Figura 4 – Comparação das contagens medianas de *Salmonella* em água de escaldagem a 62°C com pH 4, 7, e 11 em função do tempo em minutos.50
- Figura 5 – Comparação das contagens de *Salmonella* sorotipos Derby (SD) e Typhimurium (ST) a 62°C em função do tempo em minutos.51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores médios de cloro livre, matéria orgânica e turbidez de acordo com o período de coleta.....	45
Tabela 2 – Valores- $D_{62^{\circ}\text{C}}$ em minutos entre os períodos de coleta (P1, P2, P3) para os sorotipos Typhimurium e Derby estudados de acordo com o pH.	47
Tabela 3 – Contagens medianas (log UFC/ml) de <i>Salmonella</i> entre os tempos de estresse térmico e os pHs utilizados.	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	<i>Salmonella</i>	17
2.2	Características epidemiológicas de <i>Salmonella</i> sp. na cadeia produtiva de suínos	19
2.2.1	Pré-abate.....	19
2.2.2	Abate.....	20
2.3	Escaldagem	22
2.4	Sobrevivência a condições de estresse	26
2.5	Referências.....	30
3	OBJETIVOS	37
4	CAPÍTULO 1 – EFEITO DO PH E DA MATÉRIA ORGÂNICA NA RESISTÊNCIA DE <i>Salmonella</i> TYPHIMURIUM E DERBY EM ÁGUA DE ESCALDAGEM DE ABATE DE SUÍNOS	38
4.1	Resumo.....	38
4.2	Introdução	39
4.3	Material e Métodos.....	41
4.3.1	Preparo das amostras de água de escaldagem.....	41
4.3.2	Preparo dos inóculos de <i>Salmonella</i>	42
4.3.3	Teste de resistência	43
4.3.4	Análise estatística e determinação dos valores D	44
4.4	Resultados	45
4.4.1	Análises físico-químicas	45
4.4.2	Testes de resistência	46
4.5	Discussão.....	51
4.6	Conclusão	56
4.7	Referências.....	58
5	CONCLUSÃO GERAL.....	62
6	APÊNDICE – METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA SEGUNDO LANARA, 1981	65

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores alimentos, sendo, por exemplo, o quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína (ABPA, 2015). Tal prestígio por parte dos países que importam nossos produtos deve-se à habilidade dos produtores e à ampla disponibilidade de terras. E para que ocorra uma expansão ainda maior no setor é necessário que além de um crescimento em quantidade, a qualidade da matéria-prima e dos produtos produzidos se torne cada vez maior.

Um dos principais requisitos de qualidade solicitados pelos mercados importadores é a ausência de *Salmonella* spp. nos produtos, pois, a salmonelose é uma das principais doenças relacionadas ao consumo de alimentos contaminados, sendo responsável por gastos elevados com tratamentos pelos serviços de saúde no mundo. Somente nos Estados Unidos os gastos com tratamentos e hospitalizações ultrapassaram três bilhões de dólares em 2013 (USDA, 2015). No Brasil, entre os anos de 2000 e 2015, *Salmonella* foi o principal agente etiológico identificado nos surtos notificados, sendo detectada em 14,7% dos casos (BRASIL, 2015a).

Entre os tipos de alimentos envolvidos em surtos, a carne suína e seus derivados corresponderam a uma parcela de 2,1% dos casos em que foi possível a identificação do alimento, podendo ser ainda maior, uma vez que na grande maioria dos surtos o agente etiológico ou o tipo de alimento não foi identificado (BRASIL, 2015a).

Na cadeia de produção da carne suína, a infecção dos suínos por *Salmonella* ocorre na maioria dos casos de forma assintomática, tornando difícil a identificação e o controle deste patógeno (BERENDS et al., 1996; BESSA, 2006). A falta de controle deste micro-organismo nas granjas leva às altas prevalências encontradas no abate, sendo essencial a adoção de estratégias de combate a este micro-organismo no campo. Um exemplo de programa de controle que apresentou resultados significativos é o modelo Dinamarquês que através do monitoramento sorológico e microbiológico dos suínos e das granjas, conseguiu reduzir a incidência de *Salmonella* na etapa de abate e conseqüentemente no produto final (WEGENER et al., 2003).

Além do controle no campo, ações que incluem a implementação das Boas Práticas de Fabricação e de sistemas preventivos e de análise de riscos e perigos como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) devem ser tomadas para reduzir a presença de *Salmonella* no abate (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996).

Das diversas etapas do abate de suínos, a escaldagem e o chamuscamento merecem destaque pela possibilidade de redução da contaminação superficial das carcaças (BERENDS et al., 1997; HALD et al., 2003). Entretanto, se os parâmetros de escaldagem não forem suficientes para controlar adequadamente os microorganismos, este processo pode favorecer também a ocorrência de contaminações cruzadas nesta e nas etapas posteriores de abate (BOLTON et al., 2003).

No Brasil, o setor avícola difere do suinícola no abate e no processamento pelo maior avanço tecnológico e maior especificidade quanto aos requisitos ou critérios de qualidade e inocuidade dos alimentos produzidos. Parte dessa distinção entre ambos os setores é vista também em questões legais, sendo a legislação de aves mais exigente na definição de parâmetros aceitáveis de renovação de água na etapa de escaldagem que a de suínos.

A etapa de escaldagem é regulada no abate de suínos e de aves pelas Portarias nº 711/1995 e 210/1998, respectivamente (BRASIL, 1995, 1998). Nelas, requisitos da escaldagem relacionados ao controle de alguns parâmetros se diferem. Em ambas, os fatores fundamentais para o controle microbiológico como o tempo e temperatura são considerados. No entanto, o grau de contaminação da água através dos resíduos deixados pelos animais na escaldagem de suínos recebe menor importância uma vez que a renovação de água do tanque de escaldagem não é adequadamente abordada.

Independente de questões legais, para reduzir os riscos de contaminação da carne suína na escaldagem é essencial compreender os fatores, como tempo, temperatura, pH e matéria orgânica, que afetam a resistência ou sobrevivência de *Salmonella*. Por isso, a maioria das pesquisas é realizada *in vitro* para que boa parte destas variáveis, como diferentes pHs, possam ser controladas e interpretadas adequadamente.

A resistência ao calor de sorotipos de uma espécie ou até de diferentes isolados de mesmo sorotipo pode variar consideravelmente. Variações nas características genóticas ou fenóticas causadas pela adaptação ao ambiente ou

até pela expressão temporária de genes de resistência podem ser responsáveis por estas diferenças (HUMPHREY, 1981; JAY, 2005; JUNEJA; EBLEN, 2000; LINDQUIST, 1986; SÖRQVIST, 2003).

Pesquisadores sugerem que o aumento da carga orgânica da água de escaldagem pode proteger os micro-organismos patogênicos (BUNCIC; SOFOS, 2012; HUMPHREY, 1981; LETELLIER et al., 2009). Utilizando água de escaldagem de aves, Humphrey (1981) observou grandes diferenças de resistência de *Salmonella* entre a água do início e a do final do abate que possuía maior quantidade de resíduos.

Outros interferentes que podem afetar a sobrevivência dos micro-organismos na água de escaldagem são o cloro e o pH. Em concentrações adequadas, o cloro pode ter um bom poder desinfetante, entretanto, seu efeito é facilmente comprometido quando mudanças são feitas na temperatura e nos componentes do meio em que é aplicado (BOLDER, 1997; BUNCIC; SOFOS, 2012). E em água com pHs diferentes a velocidade de eliminação dos micro-organismos em água com temperatura elevada pode ser alterada (BLACKBURN et al., 1997; CASADEI et al., 2001).

Com o conhecimento do grau de impacto dos fatores que afetam a resistência de *Salmonella* na escaldagem, a definição de parâmetros ideais de tempo, temperatura, renovação de água e do uso coadjuvantes pode ser feita conforme sua relevância para a redução dos riscos de contaminação das carcaças suínas nas etapas posteriores do processo de abate. E assim garantir uma melhor qualidade microbiológica da carne que chega à mesa do consumidor.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A necessidade do aumento na produção de alimentos é uma preocupação mundial, uma vez que esta demanda deve acompanhar o crescimento da população e também o combate à desnutrição. Para suprir parte desta necessidade, a produção de carne ao longo dos anos vem aumentando de um consumo *per capita* médio de 24,2 kg em meados da década de 1960, para uma projeção de 45,3 kg em 2030 (FAO, 2015). Conforme a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), o consumo de carne está relacionado diretamente ao grau de desenvolvimento dos países. Esta relação fica clara quando comparamos a média do consumo *per capita* de carne nos países desenvolvidos (80 kg/ano) com os países em desenvolvimento (10 kg/ano) (FAO, 2013).

Em relação à carne suína, o maior produtor no mundo é a China com 56,5 milhões de toneladas de carcaças produzidas. O Brasil é o quarto maior produtor com 3,34 milhões de toneladas, sendo que a região sul do Brasil respondeu com 65,3% de todo o abate de animais de 2014 (ABPA, 2015; BRASIL, 2015b).

Este tipo cárneo é uma das principais fontes de proteína animal em diversos países como em Hong Kong e União Europeia, com consumo *per capita* de 66,50 kg e 40,20 kg em 2014, respectivamente. Neste ano, o Brasil apresentou um consumo relativamente baixo (14,6 kg) (ABPA, 2013; BRASIL, 2015c; FAO, 2015).

Concomitantemente com a necessidade de aumento na produção de carne, a preocupação com a inocuidade dos alimentos também é crescente, uma vez que pode causar grande impacto tanto para a economia, incluindo perdas de produtos, gastos com tratamentos, improdutividade, como também o aumento da mortalidade, principalmente em países menos desenvolvidos (CDC, 2015; FAO, 2013; GRADASSI et al, 2015).

As doenças transmitidas por alimentos causam mais de duzentos tipos de doenças, entre elas a diarreia que mata anualmente aproximadamente dois milhões de pessoas no mundo. As bactérias são um dos principais tipos de contaminantes dos alimentos, e entre elas o gênero *Salmonella* é o principal causador das doenças de origem alimentar, presente principalmente nos produtos de origem animal como a carne, ovos e leite (WHO, 2015).

No Brasil, dos surtos em que foi possível a identificação do alimento causador, o principal tipo de alimento relacionado são os mistos (30,6%), alimentos derivados de ovos correspondem a 15,9% e carne suína 4,3% (BRASIL, 2014). Já nos Estados Unidos, a maioria dos surtos é atribuída à carne de aves (23%) e carne suína (14%), sendo que *Salmonella* é o principal micro-organismo relacionado a estes alimentos (CDC, 2015).

Para o combate à salmonelose, é essencial conhecer as características do patógeno, como vias de transmissão, fatores intrínsecos e extrínsecos relativos à resistência, faixas de crescimento e prevalências, de forma que a identificações dos riscos de contaminação possam ser elucidados (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996).

2.1 Salmonella

Salmonella é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos, tem a forma de bastonetes curtos e pertencente à família Enterobacteriaceae. O gênero *Salmonella* possui duas espécies a *S. enterica* e *S. bongori*, dentre as quais *S. enterica* se difere por possuir uma ampla gama de hospedeiros. A espécie *S. enterica* subdivide-se em seis subespécies: enterica; salamae; arizonae; diarizonae; houtenae; e indica, entre as quais existem diversos sorotipos (CDC, 2011; GUIBOURDENCHE et al., 2010; HOLT et al., 1994; RABSCH et al., 2002).

Atualmente existem mais de 2500 sorovares de *Salmonella* identificados e que se diferem em características de doenças em hospedeiros, virulências e também nas prevalências encontradas. Esta ampla variedade é classificada baseada na composição de seus antígenos de superfície, Somático (O), Flagelares (H) e Capsulares (Vi), segundo as convenções do esquema de Kauffmann-White e sustentadas pela Organização Mundial de Saúde e o Instituto Pasteur (CDC, 2011; DIECKMANN et al., 2008; FRANCO; LANDGRAF, 2008; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Este gênero vem se adaptando a diferentes ambientes durante o curso de sua evolução pela modulação da expressão de seus genes, propriedade essencial para a sua patogenicidade (LÓPEZ et al., 2012).

São termossensíveis, destruídas a 60°C por 15 a 20 minutos, podendo se multiplicar a uma temperatura entre 7°C e 45°C. Trata-se de um micro-organismo amplamente distribuído na natureza, sendo os humanos e animais seus reservatórios. A principal via de transmissão é fecal-oral, podendo contaminar uma grande variedade de alimentos e causar gastroenterites quando ingeridas em números significantes (DE BUSSER et al., 2013; FORSYTHE, 2002; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Além dos fatores tempo e temperatura, o pH é outro fator essencial para a multiplicação deste micro-organismo, sendo capaz de se multiplicar na faixa de 4,5 a 9,0 (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996). Diversas indústrias se aproveitam deste fator isoladamente ou em conjunto com outros para combater ou prevenir contaminações na linha de produção ou ajudar na conservação dos alimentos (LEISTNER, 2000).

No Brasil, a identificação dos patógenos envolvidos nos surtos alimentares ainda é baixa. Entre os agentes etiológicos detectados, *Salmonella* sp. é o mais frequente, presente em 38,2% dos casos de 2000 a 2014, percentual similar aos Estados Unidos com 39% em 2013 (BRASIL, 2014; CDC, 2015).

Nos Estados Unidos, o sorotipo Typhimurium esteve presente em 16% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos reportados, ficando atrás apenas do sorotipo Enteritidis com 23% (CDC, 2015). Curiosamente, o sorotipo Derby é pouco relacionado a surtos humanos, mas é bastante prevalente em animais (CDC, 2014).

Em toda a cadeia produtiva de carne suína diferentes sorotipos são identificados, sendo o sorotipo Typhimurium apontado como o principal e mais prevalente (HALD et al., 2003; LI et al., 2016; MANNION et al., 2012; MARIER et al., 2014; VAN HOEK et al., 2012). O sorotipo Derby, também figura entre os mais encontrados, e foi identificado nas diversas etapas produtivas, desde a fase de criação, transporte, pocilgas de espera, até as etapas finais do processo de abate (HALD et al., 2003; LI et al., 2016; HERNÁNDEZ et al., 2013; MANNION et al., 2012; MARIER et al., 2014; VAN HOEK et al., 2012).

2.2 Características epidemiológicas de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva de suínos

2.2.1 Pré-abate

A criação de suínos é apontada como o principal reservatório de *Salmonella* com prevalência de 57,3% quando comparado com as criações de bovinos (8,5%), de aves (16,2%) e leite (17,9%), refletindo sua importância como fonte de infecções (RODRIGUEZ et al., 2006).

Dada à importância da criação dos suínos e do pré-abate, programas com objetivo de reduzir a prevalência deste micro-organismo nas criações de suínos são realizados por diversos países. Na Dinamarca, resultados importantes foram alcançados através da classificação e redução dos níveis de soroprevalência das criações que apresentam percentuais elevados. Em cinco anos de programa, nas propriedades pesquisadas por testes bacteriológicos houve reduções na proporção de 50% nas prevalências, refletindo também na diminuição da prevalência na carne suína, de 3% antes da implementação para menos de 1% (WEGENER et al., 2003). A eficácia deste programa é comprovada por Swanemburget al. (2001b) que em seus experimentos observou menores contaminações no abate com rebanhos de suínos soronegativos.

O transporte e a espera nas pocilgas de pré-abate também são etapas de grande importância para disseminação de *Salmonella*. Hernández et al. (2013), avaliou as etapas do abate, desde o transporte, espera, escaldagem, até a desossa ou esquartejamento, e identificou a presença de sorotipos iguais de *Salmonella* em praticamente todas estas etapas, indicando uma correlação entre a contaminação dos suínos no pré-abate com as etapas seguintes. Observou ainda neste estudo, presença do micro-organismo nas pocilgas e nos veículos de transporte mesmo após a higienização destes, sendo a desinfecção ineficaz das instalações um fator que eleva ainda mais o risco de contaminações cruzadas entre os animais no pré-abate.

As prevalências de *Salmonella* detectadas nas etapas de transporte e nas pocilgas de espera variam de 14,06 até 23,21%, e 4,3% a 80%, respectivamente (HERNÁNDEZ et al., 2013; MANNION et al., 2012). Estas diferenças também podem

ocorrer devido às variações nas metodologias adotadas e ao grau de contaminação dos animais transportados.

2.2.2 Abate

O abate de suínos pode ser dividido em duas áreas: a área suja, onde ocorre as etapas de insensibilização, sangria, escaldagem, depilação, chamuscagem, polimento e os toaletes; e, comumente separado por um chuveiro de carcaças, a área limpa que conta com as etapas de evisceração, toaletes, sendo finalizada pela lavagem de carcaças e o resfriamento, esta última etapa realizada em sua maioria por atividades manuais, diferente da área suja que a maior parte das etapas é automatizada (CARVAJAL et al., 2013).

Mesmo com a aplicação de medidas para combater a presença de *Salmonella* no pré-abate, uma série de ações no matadouro deve ser tomada para reduzir o número e controlar a disseminação deste patógeno. Processo de abate possui muitas etapas que elevam os níveis ou os riscos de contaminação das carcaças por bactérias, como a depilação, polimento e a evisceração, por outro lado, as etapas de escaldagem e chamuscamento causam a redução na quantidade de micro-organismos contaminantes por meio do uso do calor, mas sua eficácia depende da aplicação adequada do binômio tempo e temperatura (BERENDS et al., 1997; BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996; CARVAJAL et al., 2013).

A rota de contaminação de *Salmonella* no abate ocorre através do contato da pele e do conteúdo das vísceras dos animais com a carcaça. E outras rotas de contaminação consistem no contato desses materiais com os equipamentos ou a área de abate, os quais podem transferir a contaminação a novas carcaças (contaminação cruzada). Este risco de contaminação está ligado a diversos fatores, incluindo o a prevalência da *Salmonella* no rebanho, o grau de limpeza dos animais e das instalações, o tempo transcorrido desde o início do abate e a competência dos funcionários envolvidos. O número de animais abatidos na unidade também influencia na probabilidade de contaminação, sendo que instalações que abatem mais de 1500 animais por dia estão mais sujeitas ao risco (ARGUELLO et al., 2013; BERENDS et al., 1996, 1997; CARVAJAL et al., 2013; LETELLIER et al., 2009; MANNION et al., 2012; MARIER et al., 2014; WEGENER et al., 2003).

Para Berends et al. (1997), cerca de 70% das contaminações de carcaças de suínos é proveniente da presença do micro-organismo que já estava presente no

próprio animal abatido e o restante (30%) devido a falhas de higiene e das etapas do processo levando a contaminações cruzadas. Entretanto, a ocorrência de contaminação cruzada por meio do ambiente pode superar a contaminação decorrente do próprio animal com um percentual de sorotipos indistinguíveis encontrados em amostras da linha de abate que pode chegar até 75% (MANNION et al., 2012; MARIER et al., 2014).

Diferenças nas prevalências de *Salmonella* no abate podem ocorrer também de acordo com o local e o tipo de amostra coletada. Amostras de swabs de carcaças na sangria podem chegar a 96,6% de prevalência deste micro-organismo, com concentrações médias diárias que variam de 0,04 a 1,75 log NMP/cm². Já amostras de swab retal desta mesma etapa foram positivas em 62,5% das carcaças, com concentração média de 1,88 ± 1,42 NMP/g (VAN HOEK et al., 2012). E entre os diversos tipos de material amostrado as prevalências de *Salmonella* variam consideravelmente, por exemplo, de 3,8 a 15% em swabs de carcaça, 13,8% em amostras ambientais, de 20 a 22% em linfonodos, 22% em conteúdo cecal e 5,3% em produtos finais. Destaca-se que animais com conteúdo do ceco positivo possuem duas vezes mais chance de que suas carcaças também estejam contaminadas (BERSOT, 2005; HALD et al., 2003; MARIER et al., 2014).

Apesar da variação entre as vias e locais de contaminação das carcaças, é comum observar a redução da prevalência de *Salmonella* até as etapas finais do abate, dando destaque à importância das medidas de higiene, desinfecção e as etapas de processo que causam a redução na contaminação das carcaças quando bem aplicadas (BERENDS et al., 1997; MANNION et al., 2012; VAN HOEK et al., 2012).

Em conjunto com a aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BPF), os matadouros-frigoríficos utilizam também outras estratégias para prevenir ou reduzir a ocorrência de contaminações no abate. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), regulamenta a aplicação da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP/APPCC) nos matadouros frigoríficos como um programa de autocontrole da Circular nº 175 (MAPA, 2005) e dá orientações para aplicação através da Portaria nº 46 (MAPA, 1998). Esta última orienta a aplicação do sistema através de sete princípios, desde o conhecimento dos perigos e riscos envolvidos até o estabelecimento das ações corretivas e verificações na indústria.

Borch et al. (1996), fizeram estudo das etapas e procedimentos de abate de suínos e aponta como Pontos Críticos de Controle (PCC) etapas como a evisceração (retirada do intestino e excisão de língua, faringe e tonsilas), inspeção de carcaças e desossa de cabeça, nas quais devem ser adotadas medidas específicas para prevenir contaminações, pois não há nenhuma atividade posterior que seja capaz de remover a contaminação não visível. A espera no pré-abate e a escaldagem podem ser consideradas como Pontos de Controle (PC), pois são controlados apenas pela aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996).

2.3 Escaldagem

A etapa de escaldagem do abate de suínos tem o objetivo tecnológico causar o amolecimento dos folículos pilosos e tornar a depilação mais eficaz. Sanitariamente ela também tem importância, pois a redução de cargas microbianas nesta etapa como também no chamuscamento, refletem em um menor risco de contaminação por micro-organismos nas posteriores (BERENDS et al., 1997).

Na escaldagem por imersão, um grande número de carcaças é imersa na mesma água, tornando-a muito contaminada com resíduos de sangue, fezes, ingestas e os diversos micro-organismos presentes no suíno. Para que esta grande quantidade de contaminantes não eleve o risco de contaminação da carne suína por micro-organismos patogênicos como a *Salmonella*, é essencial conhecer melhor as características deste processo, e assim possibilitar a adoção de medidas eficazes para reduzir as contaminações cruzadas nas etapas posteriores (BOLTON et al., 2003; HALD et al., 2003).

No Brasil, a Portaria nº 711 do Ministério da Agricultura define para o processo de escaldagem de suínos a temperatura da água entre 62 e 72°C e o tempo de imersão de 2 a 5 minutos, e ainda estabelece que o processo deve ter renovação de água contínua (BRASIL, 1995). No entanto, os parâmetros quantitativos aceitáveis de renovação de água não são estabelecidos, também não há diferenciação entre os tipos de escaldagem (imersão e aspensão) e os compostos que podem ser adicionados na água nesta etapa, como o cloro e o cal. Já o

Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA, estabelece que o nível de cloro livre permitido para a indústria deve ser de no máximo 1 ppm e o cloro residual mínimo de 0,05 ppm (BRASIL, 1952).

O cloro é um desinfetante comum utilizado durante o tratamento da água. Seu efeito depende das características físicas e químicas da água, sendo afetado pela presença de compostos orgânicos e inorgânicos redutores, como sulfitos e sulfetos. Além disso, com o aumento do pH a reatividade do cloro diminui, e a temperatura elevada aumenta a velocidade das reações e ocorre a perda de seus componentes para a atmosfera, reduzindo sua ação (BUNCIC; SOFOS, 2012; MEYER, 1994). Sua eficácia como agente bactericida é relativamente baixa, pois é necessária a aplicação de elevadas concentrações de cloro na água para que reduções de um ciclo logarítmico ou mais sejam alcançadas. Pesquisas realizadas com diferentes concentrações de cloro demonstram que valores acima de 200 ppm podem ser eficazes para reduzir o número de micro-organismos. Por exemplo, em escaldagem de carcaças de cordeiro com a aplicação de água a 90°C com 250 ppm de hipoclorito de sódio é possível obter reduções em até 1,86 log UFC/cm² de mesófilos (BOLDER, 1997; JAMES et al., 2000). Entretanto, 50 ppm de cloro resultam em reduções menores que 1 log UFC/mL de coliformes em carne bovina e de aves, por exemplo (BOLDER, 1997).

Percebe-se que a concentração de cloro aceita para água potável permitida pelo RIISPOA é bastante baixa para que tenha efeito bactericida, e com a presença de outros componentes, como a matéria orgânica, o efeito do cloro seria praticamente nulo na escaldagem, porém, apesar da adição de concentrações maiores de cloro aumentar seu efeito bactericida, pode ocorrer também a formação de trihalometanos decorrentes da reação do cloro com a matéria orgânica, sendo prejudicial ao homem (BOLDER, 1997; BRASIL, 1952; JAMES et al., 2000).

O cal (óxido de cálcio) também é um componente historicamente utilizado na água de escaldagem de suínos para auxiliar na remoção dos pelos das carcaças (SWATLAND, 2006; WARNER, 1921). Quando combinado com a água, apresenta alto poder desinfetante, por isso é também comumente utilizada na desinfecção de instalações de animais (TOZZETTI et al., 2009). Trata-se de uma substância de alto poder de alcalinização.

A detecção de *Salmonella* na água do tanque de escaldagem varia entre 0 e 6%, sendo esta ocorrência influenciada principalmente pelas sujidades dos suínos e

a irregular renovação de água (BERSOT, 2005; BUNCIC; SOFOS, 2012; HALD et al., 2003; LI et al., 2016; PEARCE et al., 2004; SAMULAK et al., 2011; SEIXAS; TOCHETTO; FERRAZ, 2009; SWANENBURG et al., 2001a).

Já é esperado que a presença de *Salmonella* no tanque de escaldagem seja baixa ou ausente devido às elevadas temperaturas utilizadas no processo. Entretanto, mesmo baixas contaminações já podem ser muito relevantes, pois as condições da água utilizada têm uma relação direta com a contaminação da carne suína, reduzindo em 0,39 vezes as chances das carcaças serem positivas em água livre de *Salmonella* quando comparado a uma água contaminada (LETELLIER et al., 2009). Há também 3,5 vezes mais chances das carcaças se contaminarem por *Salmonella* durante a evisceração se a água de escaldagem já estiver contaminada (HALD et al., 2003).

Alguns fatores podem contribuir para que a *Salmonella* presente na água de escaldagem sobreviva e seja carregada para outras etapas do processo de abate. Com a imersão das carcaças, a água contendo este micro-organismo pode entrar nos pulmões e depois contaminar o ambiente de abate ou a carcaça caso ocorram aderências e rupturas no órgão durante a sua remoção (HALD et al., 2003). Este e outros micro-organismos também podem sobreviver devido a fatores, como a capacidade de se abrigar nos folículos pilosos ou rachaduras da pele dos animais, além disso, serem protegidos estando envoltos pela matéria orgânica e assim menos susceptíveis a temperatura elevada, o pH e demais fatores estressantes (LILLARD, 1989; MORILD; OLSEN; AABO, 2011; SWANENBURG et al., 2001a). Com o contato do suíno na água, mudanças estruturais ainda ocorrem na pele da carcaça favorecendo uma adesão mais firme e profunda das bactérias, e a matéria orgânica presente na água pode contribuir ainda mais para esta adesão (MORILD; OLSEN; AABO, 2011).

Um resultado que evidencia esta capacidade de sobrevivência desta bactéria é a pesquisa de Gill e Bryant (1993) que realizou amostragens de resíduos de depiladeiras de suínos (etapa posterior a escaldagem) de duas plantas de abate e observou contagens de *Salmonella* na faixa de 2 a 5,6 log UFC/g.

Pearce et al. (2004) consideraram que a escaldagem pode ser reconhecida como um PCC devido a grande redução observada na presença de *Salmonella* em swabs de carcaça, que foi de 31% depois da sangria para 1% depois da escaldagem. Esta capacidade da escaldagem de reduzir o nível de contaminação

deste patógeno nas carcaças também é evidenciada por Hernández et al. (2013), com uma redução de 36,25% antes da escaldagem para 8,75% após esta etapa.

A quantidade de matéria orgânica presente na água de escaldagem de suínos, a variabilidade genética da cepa utilizada e o meio de cultivo utilizado no ensaio podem também afetar a sobrevivência de *Yersinia enterocolitica* e de *Salmonella*, com tempos de redução decimal (valor-D) de *Y. enterocolitica* nas temperaturas de 50°C, 55°C e 60°C de 45,1-45,9 minutos, 11,0-10,6 minutos e 2,5-2,7 minutos, respectivamente; e valores-D de *Salmonella* a 50°C, 55°C e 60°C de 55,1-83,1 minutos, 5,0-7,3 minutos, 0,9-1,5 minutos, respectivamente; e ainda apresentam diferenças em relação à origem de obtenção da cepa testada a 50°C (BOLTON et al., 2003, 2013).

Em água de escaldagem do abate de aves a 60°C coletada 20 minutos após o início das atividades, o tempo para eliminação de 99% de *Salmonella* Typhimurium é de 17 minutos, e após 8 horas de operação é de 49,5 minutos. O aumento na quantidade de matéria seca e de proteínas, combinado com a redução no pH para valores próximos a 6 podem ser os responsáveis pela maior sobrevivência deste micro-organismo, possivelmente devido a um efeito tamponante dos resíduos deixados na água (HUMPHREY, 1981).

Levando em consideração os resultados obtidos de pesquisas simulando condições de escaldagem, com os parâmetros mínimos deste processo estabelecidos pela Portaria nº 711 do Ministério da Agricultura, reduções na proporção de até 5 log de *Salmonella* podem ser alcançadas com 5 minutos de escaldagem a 62°C (BOLTON; IVORY; MCDOWELL, 2013; BOLTON et al., 2003; BRASIL, 1995; JUNEJA; EBLEN, 2000). No entanto, estas reduções são observadas em modelos *in vitro* e não podem ser extrapolados adequadamente para a realidade, pois dificilmente consideram todos os fatores envolvidos na sobrevivência deste micro-organismo em condições reais. Além disso, a indefinição dos parâmetros de renovação de água nesta da Portaria nº 711 deixa em aberto às possibilidades de ocorrerem acúmulos de resíduos na água, elevando a chance de sobrevivência deste patógeno e conseqüentemente comprometendo qualidade microbiológica das carcaças.

2.4 Sobrevivência a condições de estresse

Na indústria de alimentos, métodos físicos e químicos podem ser utilizados para reduzir o grau de contaminação das carcaças e do ambiente durante o abate. A descontaminação de carcaças por métodos químicos pode ser realizada por diversos tipos de substâncias, como tratamentos baseados em cloro, fosfatos, agentes oxidantes e ácidos orgânicos (BOLDER, 1997; LORETZ; STEPHAN; ZWEIFEL, 2011). E a descontaminação por métodos físicos pode ser realizada através da temperatura, pressão, irradiação, eletricidade de campo pulsado, ultrassom e ultravioleta (BOLDER, 1997; LORETZ; STEPHAN; SONG; KANG, 2016; ZWEIFEL, 2011).

O uso de ácido peracético, cloreto de sódio acidificado e ácido láctico em carcaças bovinas refrigeradas causa reduções de até duas unidades logarítmicas de mesófilos, incluindo coliformes e *Escherichia coli*, entretanto, as concentrações aplicadas permitiram a recuperação dos micro-organismos injuriados em temperatura de refrigeração (GILL; BADONI, 2004). Já Pipek et al. (2006) conseguiram reduções na faixa de um a três log combinando a aplicação de vapor e ácido láctico, ainda observaram que o crescimento dos micro-organismos superficiais durante o armazenamento das carcaças de suínos em refrigeração foi retardado.

Micro-organismos como *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* respondem de forma diferente para cada fator estressante em que são submetidas. *Salmonella* Typhimurium é mais sensível ao pH ácido (4,0 e 4,5) do que a baixa osmolaridade (15 a 20% de NaCl), possivelmente devido ao maior gasto energético causado pelo baixo pH, já *Listeria monocytogenes* apresenta maior tolerância ao pH ácido nas mesmas condições (SHABALA et al., 2008; TIGANITAS et al., 2009).

Pequenas variações no pH, cerca de 0,5, podem resultar em uma grande diferença na sensibilidade de *Salmonella*, seja com a maior redução da população, ou pela sua maior sobrevivência a condições de pH moderadamente baixo através da utilização de mecanismos de adaptação celular (SAMELIS; IKEDA; SOFOS, 2003). Ainda, a aplicação de pH ácido como estressante para a *Salmonella* pode resultar na seleção de estirpes mais resistentes e virulentas (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012).

Bactérias podem expressar proteínas de choque tornando-as mais resistentes ou mais virulentas, propiciando também uma proteção cruzada quando a mesma é submetida a outro fator estressante diferente, sendo um problema para aplicação de obstáculos para impedir a propagação de micro-organismos nos alimentos. Para que isso ocorra é estritamente necessário que o micro-organismo passe por algum tipo de estresse como pH abaixo ou acima do ideal, temperatura baixa ou elevada, entre outros. Desta forma, medidas ineficazes de destruição de micro-organismos podem levar a um efeito abaixo do esperado (ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ et al., 2012; BURIN; SILVA; NERO, 2014; CAPOZZI et al., 2009; LEISTNER, 1994; LINDQUIST, 1992; YANG et al., 2014).

Salmonella Enteritidis e *E. coli* O157:H7 são capazes de se multiplicar melhor do que *L. monocytogenes* 1/2c em meios a 32°C, com atividade de água de 0,99 e pH 5,5, no entanto quando as condições são alteradas para 0,96 de atividade de água, pH 3 e 32°C, nenhuma das três bactérias anteriores sobrevivem, sendo que o tempo de redução decimal de *Salmonella* Enteritidis foi de quatro a seis vezes maior comparado as demais. Foi observado também que *Salmonella* Enteritidis é mais sensível à elevação na temperatura, e a 50°C *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* sofrem mais influência da atividade de água e do pH, respectivamente (GABRIEL; NAKANO, 2010).

A resistência dos micro-organismos ao calor é multifatorial. Sais, carboidratos, proteínas, pH, tamanho população microbiana, origem da cepa e a sua fase de crescimento são fatores que podem alterar esta resistência. Alguns desses fatores se devem ao fato de provocarem alterações na atividade de água do meio, visto que as bactérias são mais resistentes ao calor em ambientes com mais água do que secos (BOLTON et al., 2003; HUMPHREY, 1981; JAY, 2005). Além disso, quando mais de um fator estressante é utilizado, o grau e a ordem em que micro-organismos são submetidos às diferentes condições também são de grande importância, pois também influenciam no grau de sobrevivência apresentado (TIGANITAS et al., 2009).

Avaliando modelos de inativação térmica, Casadei (2001) e Blackburn (1997) consideram o pH entre 5,9 e 6,5 ótimo para sobrevivência de *Salmonella*, e que valores acima ou abaixo deste aumentam gradativamente a velocidade de destruição deste micro-organismo. Quando o pH reduz de 7 para 3, ocorre um

decréscimo de mais de cem vezes no valor-D de *Salmonella* submetida a elevadas temperaturas (CASADEI et al., 2001).

Blackburn (1997), em seu estudo de desenvolvimento de modelos de inativação térmica ajustou o pH em diversos valores entre 4,6 e 9,6, e concentrações de NaCl de 0,5 a 8,5% v/v e submeteu a temperaturas entre 54,5°C e 64,5°C. Dependendo das condições do teste ocorreram variações de 4,6°C a 7,0°C no valor-Z e ainda foi evidenciada uma relação de dependência entre o pH, temperatura e a concentração de NaCl, sendo que o aumento ou a redução do pH levam a uma maior taxa de inativação.

Inúmeras pesquisas comparam as resistências térmicas entre gêneros, espécies, sorotipos ou até isolados de mesmo sorotipo (BOLTON et al., 2003; CASADEI et al., 2001; HUMPHREY, 1981; JUNEJA; EBLEN, 2000; SÖRQVIST, 2003; SPINKS et al., 2006).

Entre espécies *Salmonella* Typhimurium é mais sensível em temperatura elevada ao pH (pH 3, Temp. 48°C, Etanol 0%, D=1,2 min.) e ao etanol (pH 7, Temp. 48°C, Etanol 2,5%, D=65 min.) comparado ao *Bacillus cereus* e ao *Lactobacillus delbruekii*, no entanto, quando não submetido a temperatura elevada, tem boa tolerância ao baixo pH, sendo valor-D de *Salmonella* Typhimurium a 25°C e pH 3 de 328,4 minutos, já *Lactobacillus delbruekii* de 45,7 minutos (CASADEI et al., 2001).

Sorotipos de *Salmonella* também podem apresentar respostas diferentes em temperatura elevada. Por exemplo, o tempo de destruição térmica de *Salmonella* Senftenberg a 52° C em água de escaldagem do início do abate de aves é de 14,9 minutos, maior do que do sorotipo Typhimurium que é de aproximadamente 4 minutos nas mesmas condições, este último é também muito similar a outros sorotipos como Enteritidis (3,6 minutos) e Montevideo (3,5 minutos) (HUMPHREY, 1981).

Diferenças significativas no valor-D entre estirpes de *Salmonella* Typhimurium DT104 podem ser observadas comparando cepas provenientes de diferentes regiões dos EUA, além disso, diferenças na origem das cepas (isolados de humanos e de bovinos) também apresentam variações significativas na resistência térmica deste patógeno (JUNEJA; EBLEN, 2000).

Utilizando carne bovina com variadas concentrações de gordura, a inativação térmica de *Salmonella* testada por Juneja e Eblen (2000) em banho-maria nas temperaturas de 58, 60, 62,5 e 65°C resultou em regressões com períodos de

lag e de cauda, sendo que o período *lag* pode ser atribuído à fraca transferência de calor ou a proteção das bactérias pela gordura. Considerando apenas a parte linear das regressões, o efeito da adição de gordura não foi claro, no entanto, com a adição do período *lag*, foi observada uma elevação no tempo de redução decimal proporcional a adição de gordura, variando entre 2,88 e 4,5 minutos com 7 e 24% de gordura em água a 62,5°C, respectivamente (JUNEJA; EBLEN, 2000).

Devido a todos estes fatores considerados anteriormente e outros possíveis como falhas experimentais e o método de cultivo utilizado, a destruição térmica de *Salmonella* pode apresentar um comportamento não linear, com a presença de fases *lag* ou efeito de cauda (BERMÚDEZ-AGUIRRE; CORRADINI, 2012; BLACKBURN et al., 1997; JUNEJA; EBLEN, 2000; PAGÁN et al., 1999). Estes efeitos observados muitas vezes são desconsiderados nos cálculos dos parâmetros de letalidade térmica como valor-D e valor-Z (BERMÚDEZ-AGUIRRE; CORRADINI, 2012), porém é necessário que as possíveis causas destes efeitos sejam analisadas adequadamente para evitar subestimações ou superestimações dos valores calculados.

2.5 Referências

ABPA. **Consumo Mundial de Carne Suína**. Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/consumo-2.html>>. Acesso em: 23 maio. 2015.

ABPA. **Relatório Anual**. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/mercado-mundial>>. Acesso em: 23 maio. 2015.

ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. et al. The Acid Tolerance Response of *Salmonella* spp.: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 482–492, mar. 2012.

ARGUELLO, H. et al. Prevalence, serotypes and resistance patterns of *Salmonella* in Danish pig production. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 334–342, 2013.

BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 1-2, p. 37–53, jun. 1996.

BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors spp. on pork carcasses regarding. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 199–206, 1997.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; CORRADINI, M. G. Inactivation kinetics of *Salmonella* spp. under thermal and emerging treatments: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 700–712, mar. 2012.

BERSOT, L. S. **Disseminação de *Salmonella* na cadeia produtiva de suínos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2005.

BESSA, M. C. **Caracterização Fenotípica e Genotípica de amostras de *Salmonella* enterica sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

BLACKBURN, C. W. et al. Development of thermal inactivation models for *Salmonella* enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 31–44, 19 ago. 1997.

BOLDER, N. M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 7, p. 221–227, 1997.

BOLTON, D. J. et al. Decontamination of pork carcasses during scalding and the prevention of *Salmonella* cross-contamination. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 1036–1042, 2003.

BOLTON, D. J.; IVORY, C.; MCDOWELL, D. Thermal inactivation of *Yersinia enterocolitica* in pork slaughter plant scald tank water. **Meat Science**, v. 95, n. 3, p. 668–71, nov. 2013.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 1-2, p. 9–25, 1996.

BRASIL. Decreto nº 30.691 de 29 de Março de 1952: Aprova o Novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, p. 10.785, 29 mar. 1952.

BRASIL. Portaria 711 de 01 de novembro de 1995: Normas Técnicas de Instalações e Equipamentos para Abate e Industrialização de Suínos. **Diário Oficial da União**, 1 nov. 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria N 210 de 10 de Novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, 1998.

BRASIL. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net) Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Acesso em: 23 maio. 2015a.

BRASIL. **Indicadores IBGE**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 23 maio. 2015b.

BRASIL. **Mercado Interno**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>>. Acesso em: 23 maio. 2015c.

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

BURIN, R. C. K.; SILVA, A.; NERO, L. A. Influence of lactic acid and acetic acid on *Salmonella* spp. growth and expression of acid tolerance-related genes. **Food Research International**, v. 64, p. 726–732, 2014.

CAPOZZI, V. et al. Bacterial Stressors in Minimally Processed Food. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3076–3105, 2009.

CARVAJAL, A. N. A. et al. Role of Slaughtering in *Salmonella* Spreading and Control in Pork Production. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 5, p. 899–911, 2013.

CASADEI et al. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, n. 1-2, p. 125–34, 22 jan. 2001.

CDC. **National Salmonella Surveillance Overview US Department of Health and Human Services, CDC**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. CDC, 2011.

CDC. **National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report , 2012**. Atlanta, Georgia: [s.n.].

CDC. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2013: Annual Report**. Atlanta, Georgia: [s.n.].

DE BUSSE, E. V. et al. *Salmonella* control in live pigs and at slaughter. **Veterinary Journal**, v. 196, n. 1, p. 20–27, 2013.

DIECKMANN, R. et al. Rapid classification and identification of *Salmonella* e at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 24, p. 7767–78, dez. 2008.

FAO. Feeding the world. In: ECONOMIC AND SOCIAL DEVELOPMENT DEPARTMENT (Ed.). . **FAO Statistical Yearbook 2013**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013.

FAO. **World agriculture : towards 2015 / 2030**. London, UK: [s.n.].

FORSYTHE, S. J. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: **Microbiologia e Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 162–164.

FRANCO, B. D. G. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Artmed, 2008.

GABRIEL, A. A.; NAKANO, H. Responses of *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 1/2 c and *Salmonella* enteritidis to pH, aw and temperature stress combinations. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 644–650, maio 2010.

GILL, C. O.; BADONI, M. Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 43–50, 2004.

GILL, C. O.; BRYANT, J. The presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* in pig carcass dehairing equipment. **Food Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 337–344; 18 ref, 1993.

GRADASSI, M. et al. Suitability of a *Salmonella* control programme based on serology in slaughter heavy pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 101, p. 154–160, 2015.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26–9, 2010.

HALD, T. et al. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. **Epidemiology and Infection**, v. 131, n. 3, p. 1187–203, dez. 2003.

HERNÁNDEZ, M. et al. *Salmonella* prevalence and characterization in a free-range pig processing plant: tracking in trucks, lairage, slaughter line and quartering. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 48–54, 1 mar. 2013.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HUMPHREY, T. J. The Effects of pH and Levels of Organic Matter on the Death Rates of *Salmonellas* in Chicken Scald-tank Water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 51, p. 27–39, 1981.

JAMES, C. et al. Effect of steam condensation, hot water or chlorinated hot water immersion on bacterial numbers and quality of lamb carcasses. **Journal of Food Engineering**, v. 43, n. 4, p. 219–225, 2000.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Foodborne Gastroenteritis Caused by *Salmonella* and *Shigella*. In: **Modern Food Microbiology**. 7. ed. New York: Springer Science+Business Media, 2005. p. 619–621.

JUNEJA, V. K.; EBLEN, B. S. Heat inactivation of *Salmonella* typhimurium DT104 in beef as affected by fat content. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 461–7, jun. 2000.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1-3, p. 181–6, 10 abr. 2000.

LEISTNER, L. Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation. **Journal of Food Engineering**, v. 22, n. 1-4, p. 421–432, jan. 1994.

LETELLIER, A. et al. Risk factor at slaughter associated with presence of *Salmonella* on hog carcasses in Canada. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 2326–2331, 2009.

LI, Y. et al. *Salmonella* isolated from the slaughterhouses and correlation with pork contamination in free market. **Food Control**, v. 59, p. 591–600, 2016.

LILLARD, H. S. Factors affecting the persistence of *Salmonella* during the processing of. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 11, p. 829–832, 1989.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 1151–91, jan. 1986.

LINDQUIST, S. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 2, n. 5, p. 748–55, out. 1992.

LÓPEZ, F. E. et al. *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath?. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 842–851, mar. 2012.

LORETZ, M.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Antibacterial activity of decontamination treatments for pig carcasses. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1121–1125, ago. 2011.

MANNION, C. et al. The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in Ireland. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 871–879, 2012.

MAPA. Portaria 46, de 10 de Fevereiro de 1998: Manual genérico de procedimentos para instituir o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC. **Diário Oficial da União**, 10 fev. 1998.

MAPA. Circular 175/2005/CGPE/DIPOA: Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole. **Diário Oficial da União**, 16 maio 2005.

MARIER, E. A. et al. Abattoir based survey of *Salmonella* in finishing pigs in the United Kingdom 2006–2007. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, n. 3-4, p. 542–553, 2014.

MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 99–110, 1994.

MORILD, R. K.; OLSEN, J. E.; AABO, S. Change in attachment of *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, and *Listeria monocytogenes* to pork skin and muscle after hot water and lactic acid decontamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 353–8, 31 jan. 2011.

PAGÁN, R. et al. Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* grown at different temperatures and heated in different media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 59–66, 1 mar. 1999.

PEARCE, R. A. et al. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 331–339, fev. 2004.

PIPEK, P. et al. Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 2, p. 224–231, 2006.

RABSCH, W. et al. *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and Its Host-Adapted Variants. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2249–2255, 2002.

RODRIGUEZ, A. et al. Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 11, p. 2576–2580, 2006.

SAMELIS, J.; IKEDA, J. S.; SOFOS, J. N. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: A comparative

study with *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 3, p. 563–575, 2003.

SAMULAK, R. L. et al. Condição higiênico-sanitária de abatedouro frigorífico e fábrica de embutidos no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 05, p. 408–417, 2011.

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

SHABALA, L. et al. Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 6, p. 1169–1177, 2008.

SONG, W.-J.; KANG, D.-H. Inactivation of *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Tennessee in peanut butter by 915 MHz microwave heating. **Food Microbiology**, v. 53, n. April 2009, p. 48–52, 2016.

SÖRQVIST, B. S. Review article Heat Resistance in Liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 44, n. 1, p. 1–19, 2003.

SPINKS, A. T. et al. Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1326–1332, 2006.

SWANENBURG, M. et al. *Salmonella* in slaughter pigs: Prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 243–254, 2001a.

SWANENBURG, M. et al. *Salmonella* in slaughter pigs: the effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 231–242, 8 nov. 2001b.

SWATLAND, H. J. **Slaughtering**. Disponível em: <http://www.aps.uoguelph.ca/~swatland/ch1_9.htm>. Acesso em: 16 maio. 2015.

TIGANITAS, A. et al. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a(w) stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 104–12, 31 ago. 2009.

TOZZETTI, D. S. et al. Desinfetantes, eficácia e custo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. VII, n. 12, 2009.

USDA. **Cost Estimates of Foodborne Illnesses**. Disponível em: <<http://ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses.aspx>>. Acesso em: 23 maio. 2015.

VAN HOEK, A. H. A M. et al. A quantitative approach towards a better understanding of the dynamics of *Salmonella* spp. in a pork slaughter-line. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 45–52, 1 fev. 2012.

WARNER, K. F. **PORK on the farm Killing, Curing and Canning**. 1945. ed. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, 1921.

WEGENER, H. C. et al. *Salmonella* control programs in Denmark. **Emerging infectious Diseases**, v. 9, n. 7, p. 774–780, 2003.

WHO. **Salmonella**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 7 maio. 2015.

YANG, Y. et al. Growth temperature alters *Salmonella* Enteritidis heat/acid resistance, membrane lipid composition and stress/virulence related gene expression. **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 102–109, 2014.

3 OBJETIVOS

A presente pesquisa teve o objetivo geral de avaliar a resistência térmica de *Salmonella* Typhimurium e *S. Derby* em condições similares a etapa de escaldagem no abate de suínos e com diferentes pH e concentrações de matéria-orgânica.

E tiveram-se como objetivos específicos do estudo:

- Avaliar a diferença de resistência térmica entre os sorotipos *S. Typhimurium* e *S. Derby*.
- Avaliar a interferência da matéria orgânica na destruição térmica de *S. Typhimurium* e *S. Derby* em água de escaldagem a 62°C.
- Avaliar o efeito do pH na sobrevivência de *S. Typhimurium* e *S. Derby* em água de escaldagem a 62°C.
- Determinar parâmetros de estimativa de destruição térmica de *S. Typhimurium* e *S. Derby* e tempos de redução decimal (Valor D).

4 CAPÍTULO 1 – EFEITO DO PH E DA MATÉRIA ORGÂNICA NA RESISTÊNCIA DE *Salmonella* TYPHIMURIUM E DERBY EM ÁGUA DE ESCALDAGEM DE ABATE DE SUÍNOS

4.1 RESUMO

A etapa de escaldagem do abate é capaz de reduzir grandes quantidades de contaminações superficiais das carcaças suínas, sendo assim, os riscos de contaminações cruzadas nas etapas posteriores podem estar diretamente relacionados a esta atividade. Sendo assim, é essencial conhecer os fatores associados à eficiência deste processo para reduzir as chances de sobrevivência de patógenos como *Salmonella*. Por isso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a resistência térmica de *Salmonella* Typhimurium e Derby *in vitro*, simulando a escaldagem de abate de suínos e em água com diferentes pH e concentrações de matéria-orgânica. Os sorotipos de *Salmonella* foram quantificados nos tempos 0, 1, 3 e 5 minutos em amostras de tanque de água de escaldagem com 11% de renovação coletadas com 0, 2 e 4 horas de abate aquecidas a 62°C em banho-maria. Também foram analisadas variações desta água com pH ácido, neutro e alcalino. Foram ainda realizadas análises de matéria orgânica, turbidez e cloro residual livre das amostras de água de escaldagem de cada período de coleta. Os resultados obtidos apontaram uma elevação significativa nos níveis e matéria orgânica da água no decorrer do abate, sendo a turbidez uma medida indireta de avaliação com forte correlação deste parâmetro. Em cinco minutos a 62°C houve uma redução média de 3,19 log₁₀ UFC/mL de *Salmonella* na água de escaldagem e valor-D médio de 1,65 minutos. Os sorotipos pesquisados foram mais sensíveis em água quente em pH alcalino do que em pH neutro, e a matéria orgânica não foi capaz de interferir na sobrevivência de *Salmonella*. Sendo assim uso do óxido de cálcio alcalinizando a água mostrou ser eficaz acelerando em aproximadamente 17% a destruição dos micro-organismos. As maiores reduções foram observadas com um minuto de estresse térmico, sendo o sorotipo Derby mais resistente no minuto inicial, tal fato poderia favorecer sua maior sobrevivência uma vez que *in loco* o micro-organismo pode estar localizado em regiões protegidas do animal e sofrer o estresse por um tempo ou temperatura menor. Já sem a temperatura elevada, tanto pH ácido como alcalino não apresentou efeito significativo em cinco minutos. Conclui-se que o acúmulo de matéria orgânica na água de escaldagem a 62°C por cinco minutos não foi relevante para sobrevivência de *Salmonella* e tais parâmetros mostraram ser eficientes para eliminação do micro-organismo, sendo ainda potencializado com o uso do óxido de cálcio.

Palavras-chave: cal, calor, inativação, letalidade, sobrevivência

4.2 Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a maior quantidade das doenças veiculadas por alimentos no mundo é causada pelo gênero *Salmonella*, com mais de 10 milhões de casos todo o ano (WHO, 2015). No Brasil, *Salmonella* sp. está envolvido em quase 40% dos casos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), e nos Estados Unidos da América é responsável por gastos com tratamentos e hospitalizações, que chegam a mais de 3 bilhões de dólares por ano (BRASIL, 2014; CDC, 2015; USDA, 2013).

Há uma ampla variedade de sorotipos de *Salmonella* já identificados, entre eles, Typhimurium e Derby destacam-se entre as principais envolvidas tanto na criação de suínos, na terminação, como também nos abatedouros (ARGUELLO et al., 2013; BERSOT et al., 2011; HALD et al., 2003; LI et al., 2016; VAN HOEK et al., 2012).

No processo de abate de suínos, algumas etapas podem aumentar o nível de contaminação das carcaças, como a depilação, o polimento e a evisceração, e outras podem proporcionar redução, como a escaldagem e o chamuscamento sendo estas consideradas as últimas etapas que causam redução significativa no número de micro-organismos (BERENDS et al., 1997; HALD et al., 2003). De acordo como Van Hoek et al. (2012), a presença de *Salmonella* no ambiente de abate pode chegar até a 96,6% das carcaças no início do abate e até as etapas finais este percentual pode ser reduzido em até mais de três vezes.

A escaldagem ocorre em temperaturas e tempos que diferem entre diversos países, sendo que no Brasil é realizada em temperaturas de 62 a 72°C por 2 a 5 minutos (BRASIL, 1995). E se a escaldagem for realizada em temperaturas reduzidas, o risco das carcaças serem contaminadas nas etapas posteriores do abate de suínos pode ser dobrado (HALD et al., 2003). Para que os parâmetros de escaldagem possam ser regulados de forma eficiente para o controle e eliminação de *Salmonella*, é necessário que os efeitos que cada um deles ocasiona na resistência deste micro-organismo possam ser conhecidos.

Das pesquisas de resistência ao calor já realizadas, mesmo estudos muito semelhantes apresentaram resultados diferentes. Uma das causas dessas diferenças é a variabilidade entre sorotipos. *S. Senftenberg* é considerado o mais

resistente com valor- $D_{52^{\circ}\text{C}}$ de 14,9 até 27,3 minutos em água de escaldagem de aves, muito maior que o observado com outros sorotipos (HUMPHREY, 1981).

A entrada dos suínos no tanque de escaldagem eleva a quantidade de resíduos como fezes, urina e sujidades da pele que são deixadas na água (BOLTON et al., 2003). Por isso, o grau de renovação da água passa a ser um fator que pode ser importante na definição de parâmetros adequados para redução da contaminação neste processo. Pois, com a maior concentração de proteínas na água, *Salmonella* pode resistir também por um tempo maior a temperatura elevada (BUNCIC; SOFOS, 2012; HUMPHREY, 1981; JAY, 2005; SÖRQVIST et al., 1990).

Do início ao término do dia de abate há também uma elevação da contaminação por *Salmonella* no ambiente do matadouro (HALD et al., 2003) que eleva os riscos de contaminações cruzadas. Pode haver uma relação deste aumento na contaminação ambiental com a constante elevação da matéria orgânica na água de escaldagem. Utilizando água de escaldagem do início e término do abate de aves, Humphrey (1981), observou diferenças significativas no valor-D de diversos sorotipos *Salmonella*, entre eles houve um aumento de até 30 minutos com o sorotipo Typhimurium na água de escaldagem do final do abate a 52°C.

Outro fator relevante é o pH da água, *Salmonella* é mais sensível a condições de pH abaixo de 4,5 e acima de 9. Já a faixa entre 4,5 e 9 permite que *Salmonella* possa se multiplicar se as demais características do meio em que está forem propícias, sendo que a sua maior resistência a temperaturas elevadas ocorre em um pH levemente ácido, de 5,9 a 6,5 (BLACKBURN et al., 1997; BORCH; NESBAKKEN; CHRISTENSEN, 1996; CASADEI et al., 2001; MAÑAS et al., 2003).

Historicamente, coadjuvantes eram recomendados para serem adicionados na escaldagem, como o óxido de cálcio (cal virgem), que pode elevar o pH até valores próximos a 11, alterando também as características físicas e químicas do meio e assim facilitando a depilação (SWATLAND, 2006; WARNER, 1921). Este pH elevado pode também contribuir para eliminação de micro-organismos na escaldagem, entretanto há pouca informação sobre o uso do óxido de cálcio na literatura e sobre sua eficácia e segurança para uso na escaldagem.

Um componente que poderia interferir na resistência de *Salmonella* na escaldagem é o cloro. Trata-se de um agente oxidante comumente utilizado no tratamento da água pela sua forte ação desinfetante (MEYER, 1994), sua utilização no tratamento da água das indústrias de produtos de origem animal é recomendada

por diversos países, sendo estabelecido limites de cloro residual livre em concentrações de 0,5 ppm até 2 ppm (BRASIL, 1952, 1998; PEARCE et al., 2004). Entretanto, tais limites regulamentados são considerados muito baixos para que sua atividade bactericida seja adequada (BOLDER, 1997; JAMES et al., 2000).

A cinética de inativação pode apresentar diferenças importantes quando o meio em que a bactéria é submetida a elevadas temperaturas é modificado. A carne bovina com concentrações de gordura diferentes pode ser capaz de proteger o micro-organismo e assim elevar o valor-D, passando a apresentar uma regressão com porções não lineares com a presença de períodos *lag* e efeitos de cauda (JUNEJA; EBLEN, 2000). Em processos de duração curta, como a escaldagem, estas ocorrências poderiam favorecer ainda mais a sobrevivência dos patógenos.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a resistência térmica de *Salmonella* Typhimurium e *S. Derby* *in vitro* em condições similares a escaldagem de abate de suínos aplicando variações combinadas de pHs e concentrações de matéria-orgânica diferentes para compreender os efeitos que estes causam na eliminação destes dois sorotipos.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Preparo das amostras de água de escaldagem

Em três datas distintas foram coletadas três amostras de 1,5 litros cada de água de tanque de escaldagem de um matadouro-frigorífico de suínos, que nos dias de coleta teve um abate médio de 1.118 ± 115 carcaças com duração de cinco horas. As amostras foram coletadas em um ponto na região central do tanque entre a entrada e a saída de água em três períodos diferentes: antes do início do abate (P1), após duas horas (P2) e após quatro horas do início do abate (P3).

O tanque de escaldagem utilizado no estabelecimento tinha capacidade de 16.000 litros foi mantido com renovação constante da água com média de $11,75 \pm 2,66\%$ e a temperatura foi monitorada periodicamente com média de $63,11 \pm 0,24^\circ\text{C}$ das três repetições.

Após a coleta, as amostras de água eram imediatamente armazenadas em caixas isotérmicas com gelo e enviadas para o laboratório para a realização do

experimento. O tempo transcorrido entre coleta, chegada ao laboratório e início do experimento foi de aproximadamente 24 horas.

Após o recebimento da água, 500 mL de cada amostra dos diferentes períodos de coleta foram separados para a realização das análises de teor de cloro, matéria orgânica e turbidez, e o restante da água foi dividido em três frascos para o ajuste do pH, pré-fixados em 4, 7 e 11 cada. Estes valores foram definidos para simular condições que podem ser encontradas *in loco* dadas as possibilidades de adição de adjuvantes na água, como o óxido de cálcio.

Em um frasco não foi realizado o ajuste do pH, que apresentou valor aproximado de 11, os dois demais foram ajustados em valores aproximados a 4 e 7 com soluções de 0,1 e 1 M de HCl e NaOH. Os valores foram mensurados em potenciômetro digital (Marte®, MB-10).

Após o ajuste do pH, cada sub-amostra de água de escaldagem com diferentes pH foi dividida em 9 tubos de ensaio com alíquotas de 9 mL cada, e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Desta forma foram obtidos tubos com água de escaldagem com diferentes combinações de variáveis de pH e matéria orgânica.

As amostras separadas para as análises físico-químicas foram analisadas conforme metodologia estabelecida pela APHA (2012) para a determinação do teor de cloro e da turbidez, e a concentração de matéria orgânica conforme metodologia descrita pelo Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA (BRASIL, 1981).

4.3.2 Preparo dos inóculos de *Salmonella*

Foram utilizadas cepas de *S. Typhimurium* e *S. Derby*, sorotipadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), oriundas de fezes de suínos de um matadouro-frigorífico obtidas de um projeto de pesquisa realizado anteriormente (BERSOT, 2005).

As culturas armazenadas em ágar conservação foram transferidas para tubos de *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas para recuperação das células injuriadas. Após a incubação foram novamente transferidas para tubos *ependorf* com ágar conservação, incubadas a 37°C por 24 horas e armazenadas em refrigeração a 4°C, sendo estas culturas utilizadas durante o experimento.

O inóculo foi preparado com a transferência de uma alíquota de cada cultura para duplicatas de placas de ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, as colônias foram avaliadas quanto à sua morfologia.

A fim de se obter colônias em fase estacionária, as culturas obtidas foram transferidas das placas de ágar XLD para frascos tipo Erlenmeyer contendo 100 mL de caldo BHI e incubados em agitação com agitador orbital (Biosan®) a 37°C por 18 horas.

Em seguida as culturas foram centrifugadas (Fanem®) a 3.600xG por 15 minutos, os sobrenadantes dispensados e os *pellets* novamente suspensos em solução salina 0,85%. Em seguida, foram realizadas diluições decimais e a quantificação desta suspensão pelo método de espalhamento superficial (*spread plate*) em Ágar Triptona de Soja (TSA, Difco®). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e contadas, obtendo um inóculo com a concentração de 8-9 log UFC/mL.

Para assegurar a padronização do inóculo obtido e a fase de crescimento adequada das cepas, foi determinada previamente a curva de crescimento das mesmas cepas de *S. Derby* e *S. Typhimurium*, nas mesmas condições de incubação em caldo BHI descritas acima e com quantificações realizadas a cada duas horas desde o início da incubação até 24 horas.

4.3.3 Teste de resistência

Após o preparo dos tubos com água de escaldagem com diferentes pHs e concentrações de matéria orgânica, inicialmente cada um dos tubos foram aquecidos em banho-maria até a estabilização da temperatura a 62°C.

Durante toda a execução do teste a temperatura da água foi permanentemente monitorada com termômetro simulando as mesmas condições da água de escaldagem dos suínos.

Após a equalização da temperatura, 1,0 mL de cada um dos inóculos de *S. Derby* (SD) e *S. Typhimurium* (ST) foram transferidos assepticamente para cada uma das duplicatas dos tubos com água de escaldagem a 62°C com diferentes combinações de pH e matéria orgânica e homogeneizados por 8 segundos.

A partir da adição dos inóculos o tempo transcorrido foi registrado e nos tempos, 1 minuto, 3 minutos e 5 minutos foram retiradas alíquotas dos tubos

correspondentes previamente homogeneizados para diluição seriada em tubos de solução salina 0,85% em temperatura ambiente.

Em cada série de diluições alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas de Ágar Triptona de Soja (TSA, Difco®) conforme método de espalhamento em superfície e incubadas a 37°C por 24 horas.

Amostras de água de escaldagem em temperatura ambiente também foram inoculadas com os mesmos sorotipos de *Salmonella* e alíquotas foram retiradas nos mesmos intervalos de tempo que nos tratamentos citados anteriormente para a contagem de unidades formadoras de colônias, porém, sem serem submetidas à temperatura de 62°C. Neste caso, apenas o efeito do pH e da matéria orgânica foram avaliados.

No controle negativo, foram analisadas alíquotas de amostras de tubos de água de escaldagem de cada combinação de pH e matéria orgânica após a esterilização. Foi utilizado o método de plaqueamento em profundidade em placas de Ágar Triptona de Soja (TSA, Difco®), incubadas a 37°C por 24 horas.

4.3.4 Análise estatística e determinação dos valores D

O experimento levou em consideração um delineamento experimental com quatro variáveis (Sorotipo, pH, matéria orgânica e tempo), possibilitando 72 combinações diferentes e foi repetido três vezes.

Valores-D foram calculados com o software Microsoft Excel® 2010, utilizando a fórmula $D_{62^{\circ}\text{C}} = (T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}}) / (\log C_{\text{inicial}} - \log C_{\text{final}})$ conforme Spinks et al. (2006), sendo T = Tempo transcorrido do teste em temperatura de 62° C e C = Resultado da contagem de *Salmonella*.

Os resultados físico-químicos e os valores-D calculados foram analisados através de análise de variância ANOVA, sendo as comparações múltiplas realizadas através do teste Tukey e a correlação entre a concentração de matéria orgânica e a turbidez avaliada pelo método de Pearson.

Já as contagens obtidas dos testes de resistência em função do tempo foram analisadas através do teste de Kruskal-Wallis para comparações simples e múltiplas entre as combinações obtidas.

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do software MINITAB 17 (© 2013, 2015 Minitab, Inc.).

4.4 Resultados

4.4.1 Análises físico-químicas

Os resultados dos parâmetros físico-químicos avaliados estão agrupados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores médios de cloro livre, matéria orgânica e turbidez de acordo com o período de coleta.

Período de coleta	Cloro livre (mg/L)	Matéria orgânica (mg/L)	Turbidez (UT)
Início (TP1)	<0,02 (0) ^a	1,22 (0,27) ^a	53,67 (36,94) ^a
Meio (P2)	<0,02 (0) ^a	12,77 (0,31) ^b	138,33 (27,50) ^{ab}
Fim (P3)	<0,02 (0) ^a	19,97 (2,73) ^c	183,00 (40,62) ^b

Comparações realizadas entre colunas com nível de significância de 5%.

Desvio-padrão (DP) das médias representados entre parênteses.

Resultados obtidos de três repetições em água de escaldagem obtida em frigorífico de abate de suíno antes do processo de esterilização em autoclave.

Com relação ao cloro residual livre, em todas as amostras de água analisadas foram observados que os teores de cloro apresentaram-se em valores abaixo de 0,02 mg/L, inferiores a capacidade de detecção do método utilizado. Já para a matéria orgânica foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre as concentrações obtidas na água de escaldagem, tendo ocorrido um aumento gradual da concentração até a amostra do término do abate (T3), o que era um resultado esperado. Tal resultado pode ser claramente visualizado na figura 1.



Figura 1 – Exemplificação de amostras de água de tanque de escaldagem, sendo (A) início; (B) 2 horas de processamento e (C) 3 horas de processamento

Um comportamento semelhante à concentração de matéria orgânica também foi observado nos resultados da turbidez. Neste parâmetro houve maior

variabilidade nos resultados entre as repetições, e diferenças significativas ($P < 0,05$) ocorreram entre o início e o fim do abate, no entanto, não houve diferença significativa entre P1 e P3 (Tabela 1).

Avaliando os parâmetros de matéria orgânica e turbidez em conjunto, ambos apresentaram forte correlação ($p = 0,80$) entre seus resultados, porém, em virtude dos resultados obtidos para turbidez, a utilização do mesmo como forma indireta para mensuração da matéria orgânica da água de escaldagem é menos precisa.

A água de escaldagem apresentou pH elevado antes do ajuste, média de $11,21 \pm 0,22$, e não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) entre os períodos de coleta.

4.4.2 Testes de resistência

Considerando as contagens iniciais dos inóculos e as contagens obtidas após 5 minutos de incubação a 62°C , independentemente do sorotipo, da matéria orgânica e do pH, a diferença entre as médias das contagens do inóculo inicial ao tempo cinco foi de $3,19 \log \text{ UFC/mL}$ e, nas condições do estudo, o valor- $D_{62^{\circ}\text{C}}$ médio foi de 1,65 minutos para ambos os sorotipos estudados.

Na comparação entre sorotipos Typhimurium e Derby, desconsiderando os períodos de coleta e os pHs, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) nos valores $D_{62^{\circ}\text{C}}$ que foram de 1,61 e 1,68 minutos, respectivamente.

S. Typhimurium em água de escaldagem do meio do abate (P2) apresentou valor D menor em pH 11 (1,17 minutos) do que em pH 7 (1,91 minutos) e 4 (1,72 minutos). Entretanto nas demais interações entre sorotipos, pH e matéria orgânica não foram observadas diferenças nos valores D ($P > 0,05$), devido a maior variabilidade dos resultados, Tabela 2.

E desconsiderando os efeitos dos pHs e dos sorotipos, também não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) entre os $D_{62^{\circ}\text{C}}$ obtidos dos períodos de coleta de água de escaldagem (P1, P2 e P3) indicando que a matéria orgânica não exerceu influência sobre a resistência térmica de *Salmonella*.

Já a média das combinações em pH neutro apresentaram valor-D (1,78 minutos) maior que os demais, sendo significativamente diferente ($P < 0,05$) do pH alcalino. Indicando que *Salmonella* é mais sensível a 62°C nesta condição, com valor-D de 1,48 minutos, 16,85% menor que em pH neutro. Os tempos de redução decimal calculados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores- $D_{62^{\circ}\text{C}}$ em minutos entre os períodos de coleta (P1, P2, P3) para os sorotipos Typhimurium e Derby estudados de acordo com o pH.

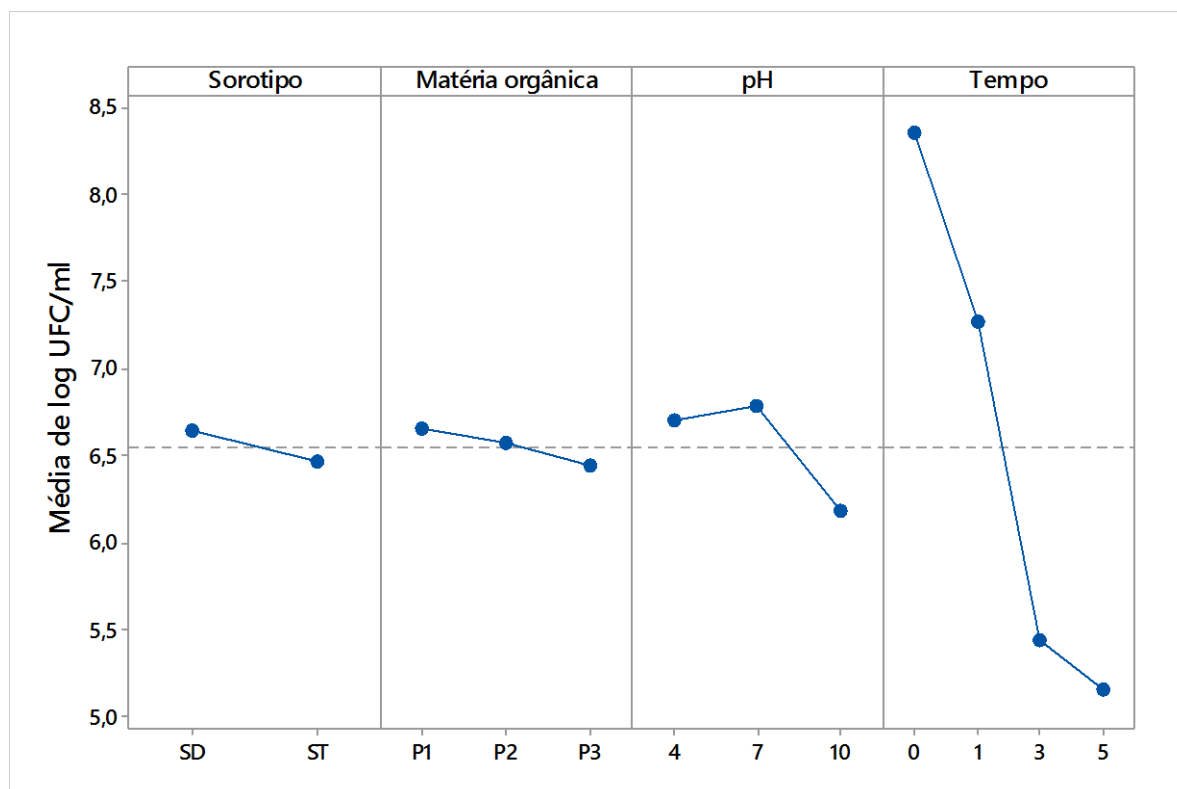
Sorotipo	Período de coleta	pH		
		4,10 ± 0,7	7,45 ± 0,42	10,90 ± 0,56
<i>Salmonella</i> Typhimurium	P1	1,53 ± 0,05 ^a	1,74 ± 0,16 ^a	1,57 ± 0,03 ^a
	P2	1,72 ± 0,13 ^a	1,91 ± 0,17 ^a	1,17 ± 0,27 ^b
	P3	1,62 ± 0,62 ^a	1,98 ± 0,32 ^a	1,31 ± 0,45 ^a
<i>Salmonella</i> Derby	P1	1,81 ± 0,72 ^a	1,54 ± 0,28 ^a	1,81 ± 0,18 ^a
	P2	1,79 ± 0,25 ^a	1,71 ± 0,35 ^a	1,44 ± 0,13 ^a
	P3	1,59 ± 0,34 ^a	1,83 ± 0,16 ^a	1,58 ± 0,05 ^a
Média		1,68 ^{ab}	1,78 ^a	1,48 ^b

Comparações realizadas entre colunas de cada linha.

Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

E apesar de o pH contribuir para maior sensibilidade da *Salmonella* a 62°C , quando avaliado em temperatura ambiente não apresentou efeito significativo ($P > 0,05$) isoladamente em cinco minutos. Este mesmo comportamento foi observado, entre os sorotipos e as diferentes concentrações de matéria orgânica.

O gráfico de efeitos observados (Figura 2) entre cada fator evidenciou o comportamento de $D_{62^{\circ}\text{C}}$ observados na análise de variância. Não houve diferença estatística nas médias logarítmicas entre os sorotipos de *Salmonella*, e apesar de ter ocorrido uma redução constante na média de UFC/mL em função da matéria orgânica, nesta pesquisa não foi possível observar diferença significativa entre as combinações deste fator, e ainda, considerando o efeito protetor esperado da matéria orgânica, o resultado observado foi contrário ao esperado. Efeitos significativos podem ser visualizados em relação ao pH e ao tempo.



SD – *Salmonella* Derby; ST – *Salmonella* Typhimurium; P – Períodos de coleta com diferentes concentrações de matéria orgânica.

Figura 2 – Efeitos das contagens médias de *Salmonella* em relação às variações de cada fator pesquisado.

As interações entre as contagens medianas de *S. Derby* e *S. Typhimurium* em água de escaldagem em temperatura de 62°C com diferentes concentrações de matéria orgânica e pHs em relação ao tempo de exposição podem ser visualizadas na Figura 3. De modo geral, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) em comparações considerando as três variáveis em conjunto (sorotipo, pH e matéria orgânica). Entretanto, quando algumas variáveis são avaliadas individualmente, como o pH ou sorotipo em relação ao tempo de exposição, apresentaram diferenças significativas.

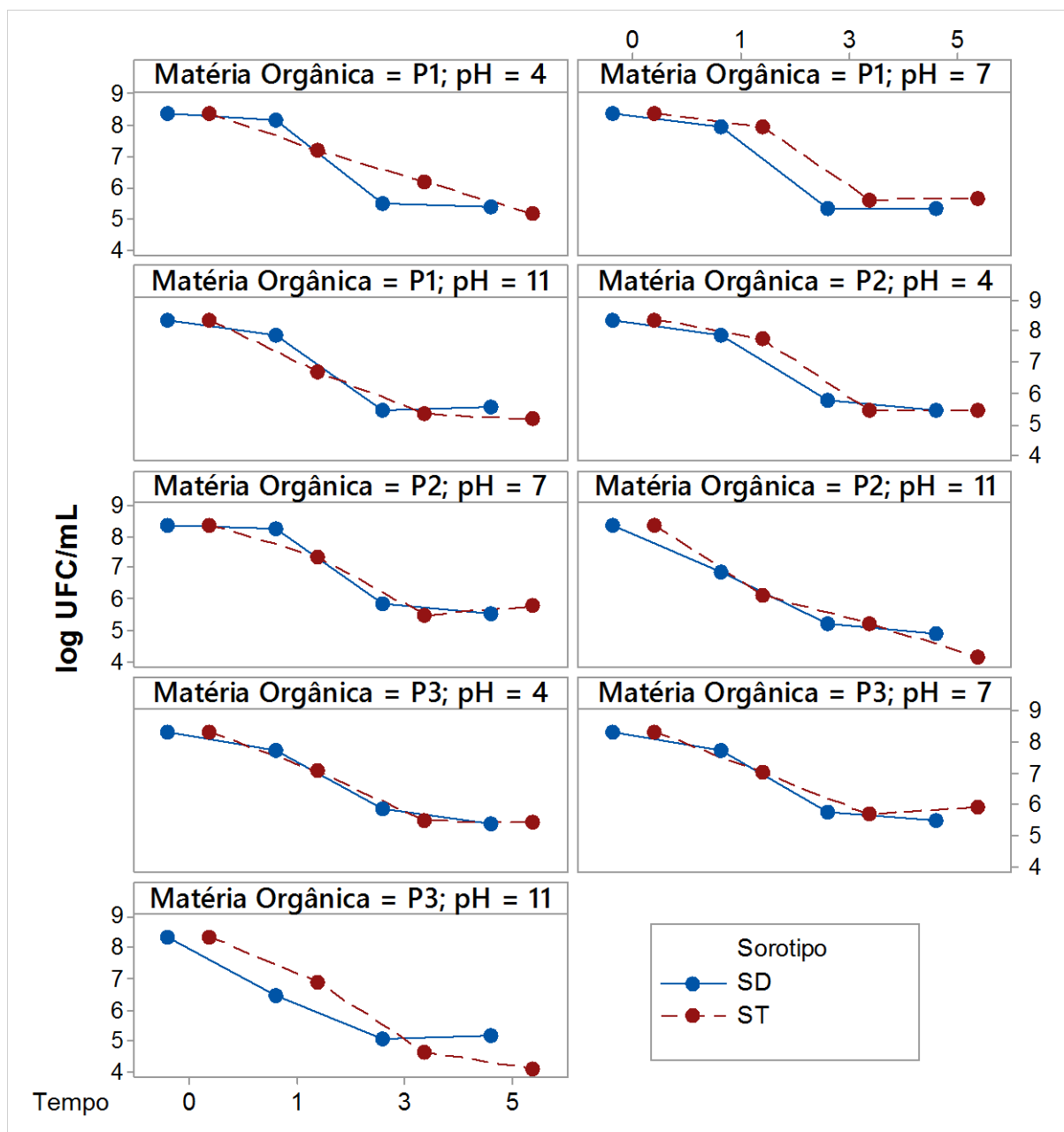


Figura 3 – Contagens medianas de *S. Derby* (SD) e *S. Typhimurium* (ST) em água de escaldagem a 62°C com diferentes variações de pH e matéria orgânica em relação ao tempo em minutos.

Considerando as medianas das contagens obtidas para cada combinação em relação ao tempo, a dispersão dos resultados foi praticamente linear nos tempos 0 a 3 e no tempo 5 ocorreu efeito de cauda, não sendo observada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tempos 3 e 5 (Tabela 3).

Tabela 3 – Contagens medianas (log UFC/ml) de *Salmonella* entre os tempos de estresse térmico e os pHs utilizados.

Tempo (minutos)	pH			Mediana ² (log UFC/ml)
	4,10 ± 0,7	7,45 ± 0,42	10,90 ± 0,56	
0	8,37 ^{a1}	8,37 ^{a1}	8,37 ^{a1}	8,37 ^{a5}
1	7,78 ^{a2}	7,89 ^{a2}	6,89 ^{b2}	7,48 ^{b5}
3	5,80 ^{a3}	5,64 ^{a3}	5,14 ^{b3}	5,46 ^{c5}
5	5,37 ^{ab4}	5,52 ^{a4}	4,13 ^{b4}	5,31 ^{c5}
Mediana¹ (log UFC/ml)	6,43 ^{ab6}	6,52 ^{a6}	5,53 ^{b6}	

Medianas que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (P<0,05).
Comparações realizadas entre as combinações de mesmo número.

Já as medianas obtidas dos pHs avaliados, desconsiderando sorotipos e concentrações de matéria orgânica, apresentaram as mesmas diferenças entre as variáveis testadas da análise dos valores-D. Entretanto, destaca-se que nas comparações diferenciando também entre os tempos, a água em pH 4 dos tempos 1 e 3 também apresentaram diferenças significativas (P<0,05) em relação a água com pH 11, Tabela 3. A maior sensibilidade de *Salmonella* em pH 11 também pode ser visualizada na Figura 4.

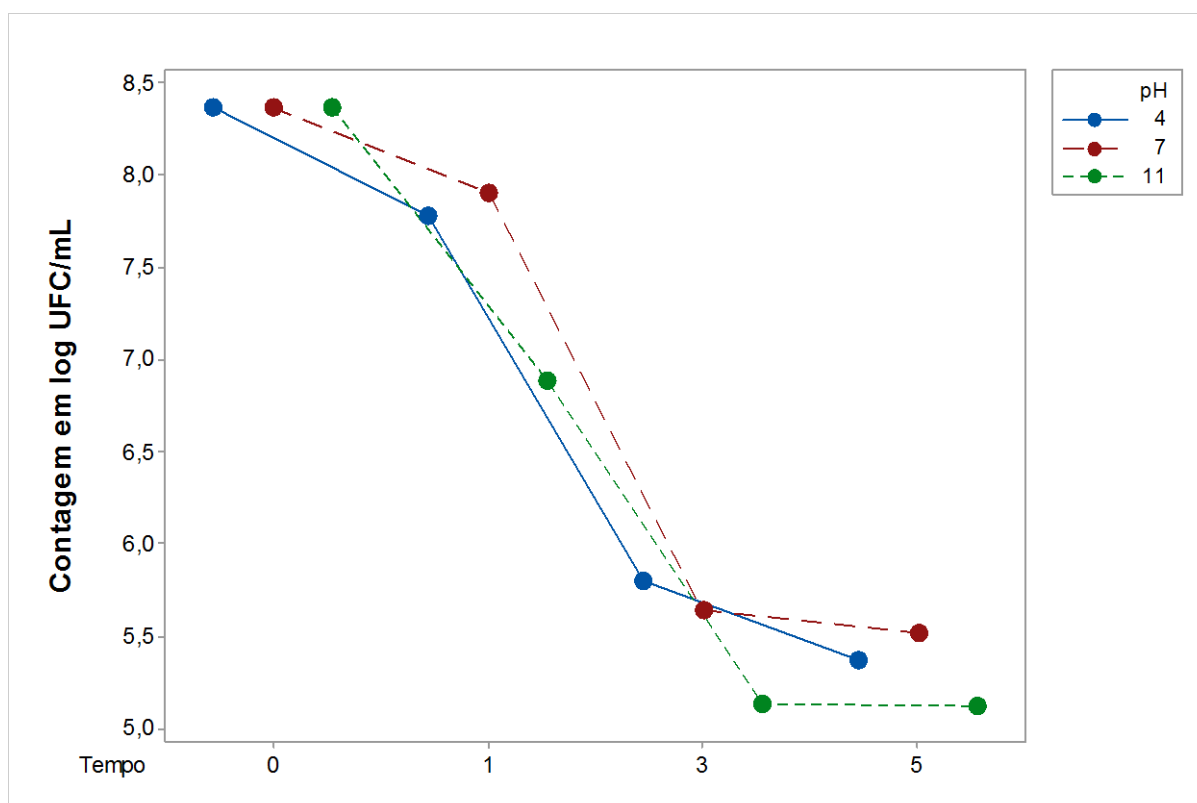
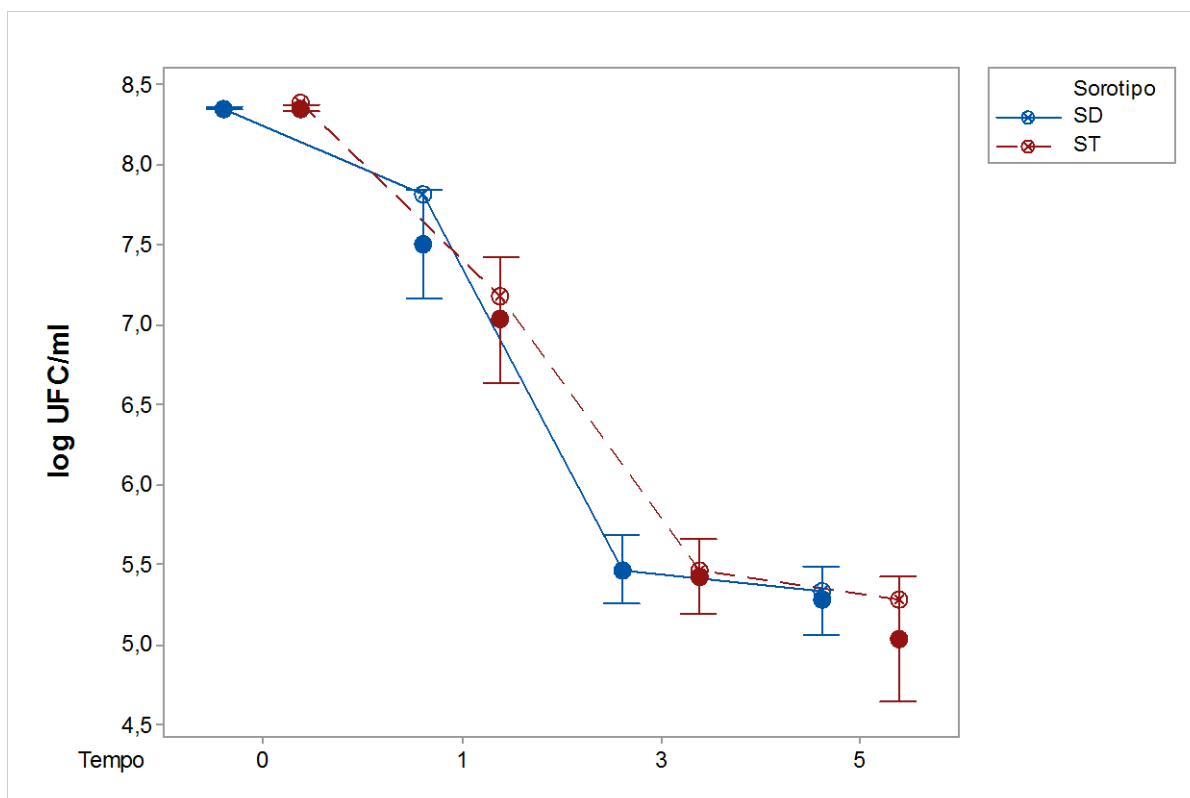


Figura 4 – Comparação das contagens medianas de *Salmonella* em água de escaldagem a 62°C com pH 4, 7, e 11 em função do tempo em minutos.

As principais diferenças entre os sorotipos por tempo, desconsiderando o efeito do pH e da matéria orgânica, foram observadas com um minuto após início do estresse térmico. *S. Typhimurium* no tempo 1 apresentou uma mediana de 7,18 log UFC/mL, menor que *S. Derby* com mediana de 7,82 log UFC/mL, diferindo significativamente ($P < 0,05$), Figura 5.



Intervalo de confiança de 95% para a média de cada sorotipo por tempo.

Pontos não preenchidos indicam a mediana e pontos cheios indicam a média de cada conjunto de dados.

Figura 5 – Comparação das contagens de *Salmonella* sorotipos Derby (SD) e Typhimurium (ST) a 62°C em função do tempo em minutos.

Já as contagens das medianas das diferentes concentrações de matéria orgânica, para ambos os sorotipos de *Salmonella* e diferentes pHs, não diferiram significativamente ($P > 0,05$) em nenhum dos quatro tempos avaliados nesta pesquisa.

4.5 Discussão

Avaliar os fatores que afetam a resistência de micro-organismos no abate de suínos é difícil quando realizada *in loco*, pois há uma grande variedade de fatores

que não podem ser controlados e parâmetros difíceis de ser padronizados. Esta pesquisa *in vitro*, buscou simular condições que escaldagem de suínos com características padronizadas para compreender melhor os efeitos da matéria orgânica e do pH entre dois sorotipos Typhimurium e Derby.

Devido a grande quantidade de micro-organismos presentes, foi necessária a esterilização da água em autoclave para adequada avaliação dos parâmetros. Segundo Humphrey (1981), a esterilização em autoclave a 121°C por 15 minutos acarreta na redução de 0,2 unidades de pH e na precipitação de proteínas da água de escaldagem de abate de aves. Neste estudo, a mesma variação de pH foi observada, assim como, a precipitação de proteínas também foi observada principalmente nas amostras de pH ácido e neutro. A presença de hidróxido de cálcio (cal) e a alta quantidade de matéria orgânica, ambos atuando como tamponantes, também dificultou o ajuste de pH da água de escaldagem e causou diferenças nos pHs ajustados.

O cloro livre pode reagir com a matéria orgânica e outros componentes presentes na água (BUNCIC; SOFOS, 2012; LORETZ; STEPHAN; ZWEIFEL, 2011; MEYER, 1994). Por ser volátil, parte do cloro da água também pode ter sido perdido no tempo transcorrido entre a coleta e o transporte, e a temperatura elevada durante a esterilização ainda acelerado sua reação com os componentes da água, reduzindo o cloro residual livre a níveis muito baixos ou nulos, insignificantes para afetar a eliminação da *Salmonella*. O efeito do cloro combinado com a água foi observado por James et al. (2000) com reduções de até 1,86 log UFC/cm², entretanto com concentração de 250 ppm.

Os valores-D_{62°C} observados neste estudo, média de 1,65 minutos, foram maiores que os descritos por Bolton et al. (2003), que mesmo utilizando uma temperatura uma inferior, obteve D_{60°C} entre 0,9 a 1,5 minutos. Entretanto, foram inferiores aos tempos de destruição térmica de 3,77 a 4,5 minutos em água com diferentes percentuais de gordura testados por Juneja e Eblen (2000). Possivelmente o efeito protetor da matéria orgânica é inferior ao da gordura, entretanto, ressalta-se que neste estudo houve ainda precipitação de parte das proteínas presentes e a ausência de outros micro-organismos devido à esterilização da água que também podem afetar a resistência da *Salmonella*.

Considerando ainda que os valores D_{60°C} descritos acima por Bolton et al. (2003) foram obtidos com água de escaldagem obtidas após 4 horas de abate, neste

mesmo período de coleta, os valores D nesta pesquisa variaram entre 1,17 e 1,98 minutos. Ressalta-se que os menores valores-D observados nesta pesquisa, 1,17 e 1,31 minutos, foram de ensaios em água com pH alcalino através da adição do cloro. Porém, esta informação não foi descrita por Bolton et al. (2003), e ainda a informação do número de animais que entram no tanque é importante, pois pode estar diretamente relacionada com o grau de contaminação da água.

Conforme relatado por Hald et al. (2003), o nível de contaminação durante o processo de abate é constantemente elevado, aumentando em até quatro vezes os riscos de serem encontrados resultados positivos no final do dia. Tal afirmação poderia ter relação com o aumento constante da quantidade de matéria orgânica no tanque de escaldagem com renovação de 11% observado neste estudo e também por Humphrey (1981), porém, diferente das diferenças encontradas por Humphrey (1981) que simulou escaldagem de aves a 52°C, esta pesquisa não encontrou diferenças significativas entre as concentrações de matéria orgânica provenientes das amostras início e do final do abate, ocorrendo ainda indícios de um efeito contrário ao exposto pelo autor, talvez a elevação da temperatura até 62°C seja capaz de encobrir o efeito protetor da matéria orgânica e o tempo de cinco minutos deste estudo também seria insuficiente para evidenciar este efeito.

Uma vez que os efeitos da concentração de matéria orgânica fossem significativos para aumentar a sobrevivência de *Salmonella* na água, a aferição desta concentração através da turbidez poderia ser uma alternativa de teste rápido para a indústria realizar de ajustes na renovação da água dos tanques de escaldagem durante o abate. Entretanto os resultados observados neste estudo evidenciaram a menor precisão da avaliação da turbidez da água.

As interações entre os fatores, sorotipo e matéria orgânica, sorotipo e pH e pH e matéria orgânica não foram significativas ($P > 0,05$) para o modelo ajustado deste estudo. De modo geral *Salmonella* Derby foi significativamente ($P < 0,05$) mais resistente que *S. Typhimurium* até o minuto inicial da escaldagem, entretanto as quantidades se igualam no decorrer do tempo. Diferente do encontrado por Humphrey (1981) em que observou diferenças entre os sete sorotipos testados por ele. Ainda, variações entre diferentes origens de isolados do mesmo sorotipo podem ocorrer em até quase um minuto de diferença no valor-D (JUNEJA; EBLEN, 2000). Possivelmente a maior resistência da *S. Derby* no início desta simulação de escaldagem possa ser relevante *in loco*, dada à possibilidade dos micro-organismos

se albergarem em fissuras ou camadas mais profundas da pele dos animais (MORILD; OLSEN; AABO, 2011) e assim permanecerem em menor tempo em contato com a temperatura elevada. Van Hoek et al. (2012), detectou o sorotipo Derby em maiores percentuais que o Typhimurium após a escaldagem em diferentes pontos do processo de abate. Entretanto, esta possibilidade de diferenciação pode não ser clara, uma vez que isolados de abate de ambos os sorotipos também foram encontrados em quantidades praticamente iguais por Pearce et al. (2004), e nos surtos alimentares o sorotipo Typhimurium é muito mais isolado que o Derby nos casos DTA identificados (CDC, 2014; PEARCE et al., 2004).

O efeito de cauda observado entre os tempos 3 e 5 também é descrito por outros autores em diferentes tempos após o início da destruição térmica das bactérias (BLACKBURN et al., 1997; BOLTON et al., 2003; JUNEJA; EBLEN, 2000). Este efeito e também o de *lag* alteram a ideia de que a destruição térmica ocorre de modo linear, pelo menos em condições não ideais. Eles podem ocorrer pela proteção causada por agregados de células juntamente com a matéria orgânica e pela resistência da *Salmonella* através da produção de proteínas de choque (BERMÚDEZ-AGUIRRE; CORRADINI, 2012; BOLTON et al., 2003; LINDQUIST, 1986, 1992). Apesar de ser uma resposta temporária, uma vez que as proteínas de choque são produzidas, as bactérias podem resistir mais a estresses subsequentes ou então se tornarem mais virulentas ou invasivas (NIELSEN et al., 2013).

O valor-D dos resultados deste estudo foi calculado considerando os efeitos de calda observados, diferente do realizado por alguns autores que utilizam apenas a parte em linha reta de seus resultados (BERMÚDEZ-AGUIRRE; CORRADINI, 2012; JUNEJA; EBLEN, 2000; PAGÁN et al., 1999; SPINKS et al., 2006). Entretanto, não adicionar estes efeitos no cálculo, pode evitar subestimações se estes forem devido a falhas experimentais, ao método de cultivo utilizado ou outros que não relacionados à resistência do micro-organismo.

A maior sensibilidade da *Salmonella* em pH alcalino do que em ácido também foi observada por Humphrey (1981) e Mañas et al. (2003). Conforme Blackburn et al. (1997) o pH ótimo para sobrevivência de *Salmonella enteritidis* está entre 5,9 a 6,5, e este deslocamento de afinidade para um pH ligeiramente ácido pode estar relacionado ao observado neste estudo. Sendo assim a alcalinização da água de escaldagem com o óxido de cálcio além de contribuir para a remoção dos pelos, poderia também contribuir para eliminar uma maior quantidade de micro-

organismos nesta etapa de processo por estar mais distante da condição de maior resistência, reduzindo em aproximadamente 17% o tempo de redução decimal.

A cal (óxido de cálcio) possui baixo custo, tem poder desinfetante e é utilizada na desinfecção de ambiente como instalações de animais (TOZZETTI et al., 2009). Há muitos anos que a cal era recomendada na escaldagem de suínos e atualmente ainda é utilizada em alguns abatedouros (WARNER, 1921). Entretanto, não são conhecidos claramente os possíveis riscos que os resíduos deste componente poderiam causar para saúde do consumidor.

As diferenças entre as concentrações de matéria orgânica e entre o pH poderiam ser mais evidentes com um tempo maior do que os cinco minutos deste estudo, mas desviam do tempo máximo estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 1952, 1995). Para obter reduções de até 4 log de *Salmonella* Typhimurium, Tiganitas et al. (2009) precisaram submeter este sorotipo por mais de 719 horas em pH 4,5 e a 10°C. Como a matéria orgânica não exerce um efeito deletério e sim protetor, este foi menos impactante em um curto período de tempo do que o efeito deletério do pH, onde foi possível observar diferenças significativas entre pH neutro e alcalino em temperatura elevada neste estudo, mas em temperatura ambiente os valores-D não diferiram significativamente ($P > 0,05$) em nenhum dos fatores testados. A baixa diferença entre os valores-D dos pHs ácido e neutro observados neste estudo, diferem do tempo de redução descrito por Mañas et al. (2003), que do pH 6 para 4 a 56°C reduziu o valor-D de 2,2 para 0,89 minutos.

A relação entre a infecção dos animais no pré-abate com a contaminação das carcaças no abate, seja a contaminação proveniente da própria carcaça como cruzada através do contato entre carcaças ou por intermédio dos equipamentos utilizados no abatedouro (BERENDS et al., 1997; MANNION et al., 2012; MARIER et al., 2014), pode trazer o foco do controle de contaminação para o pré-abate. De fato, apesar da elevada temperatura da água de escaldagem reduzir grande parte dos contaminantes, se uma carga muito grande de micro-organismos estiver entrando constantemente no tanque, esta água pode se tornar um meio de contaminação cruzada entre as carcaças, além disso, a eliminação dos patógenos na escaldagem ocorre basicamente na superfície externa das carcaças e ainda há o risco de contaminação pelo conteúdo do trato gastrintestinal e linfonodos das carcaças.

Se a água de escaldagem estiver contaminada durante o abate, o maior risco de ocorrerem contaminações cruzadas pode ser devido à entrada da água

contaminada através da boca, da garganta e pelos pulmões do animal, espalhando pelo ambiente durante a evisceração (HALD et al., 2003).

Van Hoek et al. (2012) encontrou concentrações de *Salmonella* na sangria entre 0,4 e 1,75 log NMP/cm² na superfície de carcaças de suínos e aproximadamente 1,88 log NMP/g em amostras de swab retal. Comparando os resultados obtidos pela autora com os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira utilizada neste estudo, a água a 62°C por 5 minutos pode oferecer boa segurança para o processo de abate uma vez que seria capaz de reduzir quase duas vezes a quantidade detectada nas superfícies das carcaças, se os demais fatores não testados neste estudo fossem irrelevantes. E sua eficiência para eliminação de micro-organismos foi também comprovada por Pearce et al. (2004) *in loco*, sendo este ponto recomendado pelo autor para ser considerado também como um Ponto Crítico de Controle do programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP). Ainda, o fato do parâmetro de renovação de água não ser claramente definido, de acordo com esta simulação não seria relevante para a sobrevivência de *Salmonella* no tanque, entretanto ficou claro o acúmulo de resíduos orgânicos.

4.6 Conclusão

Em água de escaldagem a 62°C por 5 minutos, a ação protetora proveniente da matéria orgânica presente na água de escaldagem não ocorreu e não houve qualquer efeito significativo na sobrevivência de *Salmonella*, independentemente dos sorotipos estudados e da interferência do pH.

O sorotipo *S. Derby* foi significativamente mais resistente que o *S. Typhimurium* após um minuto de estresse térmico, porém, não apresentou diferenças após três e cinco minutos em água de escaldagem a 62°C.

A água a 62°C com óxido de cálcio a um pH de aproximadamente 11, foi mais eficaz para a eliminação de *Salmonella* do que em meio ácido ou neutro, indicando que, além de auxiliar tecnologicamente na depilação, também contribui para maior eliminação de *Salmonella*.

Considerando os valores-D obtidos neste estudo, a água de escaldagem a 62°C é capaz de reduzir concentrações de até 3 log UFC/mL de *Salmonella* na simulação em cinco minutos, sendo o binômio tempo x temperatura uma importante variável para reduzir as contaminações nas etapas posteriores de abate.

4.7 Referências

APHA. **Standard Methods for examination of Water and Wastewater** (American Water Works Association, Ed.). Washington, DC: American Public Health Association, 2012

ARGUELLO, H. et al. Prevalence, serotypes and resistance patterns of *Salmonella* in Danish pig production. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 2, p. 334–342, 2013.

BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 1-2, p. 37–53, jun. 1996.

BERENDS, B. R. et al. Identification and quantification of risk factors spp. on pork carcasses regarding. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 199–206, 1997.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; CORRADINI, M. G. Inactivation kinetics of *Salmonella* spp. under thermal and emerging treatments: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 700–712, mar. 2012.

BERSOT, L. S. **Disseminação de *Salmonella* na Cadeia Produtiva de Suínos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2005.

BERSOT, L. S. et al. Potencial de disseminação de *Salmonella* sp. proveniente de linfonodos mesentéricos de suínos abatidos na região oeste do paraná para superfície de mesa de inspeao de vísceras brancas, facas e luvas de auxiliares de inspeao durante a inspeao post-mortem. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 530–535, 29 set. 2011.

BLACKBURN, C. W. et al. Development of thermal inactivation models for *Salmonella* enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 31–44, 19 ago. 1997.

BOLDER, N. M. Decontamination of meat and poultry carcasses. **Trends in Food Science and Technology**, v. 8, n. 7, p. 221–227, 1997.

BOLTON, D. J. et al. Decontamination of pork carcasses during scalding and the prevention of *Salmonella* cross-contamination. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 1036–1042, 2003.

BORCH, E.; NESBAKKEN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 1-2, p. 9–25, 1996.

BRASIL. Decreto n 30.691 de 29 de Março de 1952: Aprova o Novo Regulamento da Inspeao Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, p. 10.785, 29 mar. 1952.

BRASIL. **Métodos Analíticos para Controle de Produtos de origem animal e seus Ingredientes Métodos Físico - Químicos. Portaria N° 1, de 07 de outubro de 1981**: LANARA.Ministerio da Agricultura. Diário Oficial da União, , 1981.

BRASIL. Portaria 711 de 01 de novembro de 1995: Normas Técnicas de Instalações e Equipamentos para Abate e Industrialização de Suínos. **Diário Oficial da União**, 1 nov. 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria N 210 de 10 de Novembro de 1998. Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, 1998.

BRASIL. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN net)**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis.Brasília, DF, 2014.

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

CASADEI et al. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, n. 1-2, p. 125–34, 22 jan. 2001.

CDC. **National Enteric Disease Surveillance : Salmonella Annual Report , 2012**. Atlanta, Georgia: [s.n.].

CDC. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2013: Annual Report**. Atlanta, Georgia: [s.n.].

HALD, T. et al. The occurrence and epidemiology of *Salmonella* in European pig slaughterhouses. **Epidemiology and Infection**, v. 131, n. 3, p. 1187–203, dez. 2003.

HUMPHREY, T. J. The Effects of pH and Levels of Organic Matter on the Death Rates of *Salmonellas* in Chicken Scald-tank Water. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 51, p. 27–39, 1981.

JAMES, C. et al. Effect of steam condensation, hot water or chlorinated hot water immersion on bacterial numbers and quality of lamb carcasses. **Journal of Food Engineering**, v. 43, n. 4, p. 219–225, 2000.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JUNEJA, V. K.; EBLEN, B. S. Heat inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in beef as affected by fat content. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 461–7, jun. 2000.

LI, Y. et al. *Salmonella* isolated from the slaughterhouses and correlation with pork contamination in free market. **Food Control**, v. 59, p. 591–600, 2016.

LINDQUIST, S. The heat-shock response. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 1151–91, jan. 1986.

LINDQUIST, S. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 2, n. 5, p. 748–55, out. 1992.

LORETZ, M.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Antibacterial activity of decontamination treatments for pig carcasses. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1121–1125, ago. 2011.

MAÑAS, P. et al. Predicting thermal inactivation in media of different pH of *Salmonella* grown at different temperatures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 1-2, p. 45–53, out. 2003.

MANNION, C. et al. The role of transport, lairage and slaughter processes in the dissemination of *Salmonella* spp. in pigs in Ireland. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 871–879, 2012.

MARIER, E. A. et al. Abattoir based survey of *Salmonella* in finishing pigs in the United Kingdom 2006–2007. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, n. 3-4, p. 542–553, 2014.

MEYER, S. T. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. 1, p. 99–110, 1994.

MORILD, R. K.; OLSEN, J. E.; AABO, S. Change in attachment of *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, and *Listeria monocytogenes* to pork skin and muscle after hot water and lactic acid decontamination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 353–8, 31 jan. 2011.

NIELSEN, M. et al. Comparison of heat stress responses of immobilized and planktonic *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 221–227, 2013.

PAGÁN, R. et al. Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* grown at different temperatures and heated in different media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 59–66, 1 mar. 1999.

PEARCE, R. A. et al. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 331–339, fev. 2004.

SÖRQVIST, S. et al. Survival of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Yersinia* spp. in scalding water used at pig slaughter. **Fleischwirtsch**, v. 70, p. 1451–1454, nov. 1990.

SPINKS, A. T. et al. Thermal inactivation of water-borne pathogenic and indicator bacteria at sub-boiling temperatures. **Water Research**, v. 40, n. 6, p. 1326–1332, 2006.

SWATLAND, H. J. **Slaughtering**. Disponível em: <http://www.aps.uoguelph.ca/~swatland/ch1_9.htm>. Acesso em: 16 maio. 2015.

TIGANITAS, A. et al. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a(w) stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 104–12, 31 ago. 2009.

TOZZETTI, D. S. et al. Desinfetantes, eficácia e custo. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. VII, n. 12, 2009.

USDA. **Cost Estimates of Foodborne Illnesses**. Disponível em: <[http://http://www.fsis.usda.gov/](http://www.fsis.usda.gov/)>. Acesso em: 7 maio. 2015.

VAN HOEK, A. H. A M. et al. A quantitative approach towards a better understanding of the dynamics of *Salmonella* spp. in a pork slaughter-line. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1-2, p. 45–52, 1 fev. 2012.

WARNER, K. F. **PORK on the farm Killing, Curing and Canning**. 1945. ed. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, 1921.

WHO. **Salmonella**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 7 maio. 2015.

5 CONCLUSÃO GERAL

As etapas do abate de suínos são inter-relacionadas de modo que a maior contaminação em uma etapa afeta as seguintes através de contaminações cruzadas. Entre essas etapas, a de escaldagem, quando bem ajustada, pode atuar como um filtro reduzindo a presença de *Salmonella* e de outros micro-organismos patogênicos no processo de abate.

A quantidade de matéria orgânica, controlada através do percentual de renovação de água do tanque de escaldagem não teve efeito significativo para sobrevivência de *Salmonella*, sendo assim, a indefinição dos parâmetros de renovação de água pela Portaria nº 711 de 01 de novembro de 1995 (BRASIL, 1995) podem ser pouco importante desde que o tempo e a temperatura mínima sejam respeitados.

A água com o pH alcalino mostrou ser mais eficaz, potencializando a letalidade térmica de *Salmonella*. Esta condição está ligada diretamente a adição do óxido de cálcio na água de escaldagem, demonstrando que o cal além de contribuir para remoção dos pelos das carcaças também auxilia na redução da contaminação. Porém, as informações sobre o uso deste componente são escassas e antigas, muito menos quando relacionadas à segurança para o consumidor.

Os sorotipos Typhimurium e Derby apresentaram um comportamento diferente na cinética de destruição térmica, sendo o sorotipo Derby mais resistente no minuto inicial, diferença que não foi significativa considerando todo o tempo de estresse térmico do experimento. As curvas de letalidade de ambos demonstraram que em condições de escaldagem as reduções não são lineares, apresentando uma queda mais acentuada no contato inicial e com reduções mínimas nos minutos finais. Uma das explicações para este comportamento pode ser a produção de proteínas de choque pelas bactérias.

As reduções obtidas na pesquisa desta dissertação demonstraram uma boa eficácia de destruição de *Salmonella* em condições similares a da escaldagem industrial, com reduções maiores que as contagens deste mesmo micro-organismo obtidas em etapas anteriores citadas por outros autores. Por isso, a água de escaldagem a 62°C é eficaz para destruição da *Salmonella*, podendo ainda minimizar os efeitos de outros fatores como pH e a matéria orgânica.

Considerando que a etapa de criação e o pré-abate são as principais fontes da contaminação das carcaças, sendo o próprio animal o carreador é essencial que ações de controle nas propriedades sejam adotadas, reduzindo os riscos de contaminações nas etapas posteriores.

De modo geral, os parâmetros de escaldagem definidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o abate de suínos são eficazes para a eliminação de *Salmonella* conforme os resultados obtidos por este estudo *in vitro*. Ressalta-se que *in loco* outros fatores também podem contribuir para sobrevivência do patógeno, como as próprias carcaças, a proteção das bactérias em folículos, fissuras, pulmões, intestino, entre outros.

A importância da etapa de escaldagem para a maior segurança da carne suína foi evidenciada neste estudo. Espera-se que as informações fornecidas por esta e outras pesquisas possam contribuir para que ocorram ainda mais avanços na segurança dos alimentos produzidos.

APÊNDICE

6 APÊNDICE – METODOLOGIA DE DETERMINAÇÃO DE MATÉRIA ORGÂNICA SEGUNDO LANARA, 1981

6.1 Oxigênio consumido por matéria redutora de permanganato

6.1.1 Matéria orgânica

A medida da matéria orgânica fundamenta-se na oxidação da matéria orgânica pelo oxigênio ativo liberado pelo permanganato de potássio quando aquecido em meio ácido forte. O teste não diferencia matéria orgânica estável da matéria orgânica instável. Os nitritos, compostos ferrosos, sulfetos e outras substâncias oxidáveis reduzem o permanganato.

6.1.2 Material

Balança analítica
Béquer de 2000 mL
Erlenmeyer de 250 mL
Proveta de 25 mL
Bureta de 25 mL
Balão volumétrico de 100 e 1000 mL
Pipeta volumétrica de 10 mL

6.1.3 Reagentes

Solução de ácido sulfúrico a 25%
Solução de permanganato de potássio 0,125 N e 0,0125 N
Solução de ácido oxálico 0,125 N e 0,0125 N

6.1.4 Preparo dos reagentes

6.1.4.1 Solução de ácido sulfúrico a 25% isento de matéria orgânica:

Em béquer de 2000 mL colocar 750 mL de água destilada. Com o devido cuidado adicionar 250 mL de ácido sulfúrico concentrado. Aquecer durante 30

minutos, mantendo o líquido em ebulição e adicionando solução de permanganato de potássio para manter ligeira coloração rósea.

6.1.4.2 Solução de permanganato de potássio 0,125 N

Pesar cerca de 4 g de permanganato de potássio, transferir para Erlenmeyer de 2000 mL e adicionar 1100 mL de água destilada. Aquecer a ebulição pelo menos por 15 minutos ou até que o volume fique próximo de 1000 mL. Esfriar a temperatura ambiente. Fechar o frasco e deixar em repouso pelo menos 2 a 3 dias (melhor 1 semana). Filtrar através de cadinho de vidro sintetizado de porosidade fina, previamente lavado com ácido sulfúrico e depois com água destilada recente. A solução poderá também ser filtrada através de lã de vidro preparada do mesmo modo que o cadinho. Deixar envelhecer mais 1 semana. O permanganato de potássio envelhecido e filtrado será padronizado com solução de oxalato de sódio. Guardar em frasco âmbar com tampa de vidro.

6.1.4.3 Titulação da solução de KMnO_4 0,125 N

Secar o oxalato de sódio em estufa a 110° até peso constante. Pesar em balança analítica em torno de 200 mg de oxalato de sódio, transferir para Erlenmeyer e dissolver em 250 mL de água destilada. Adicionar 7 mL de ácido sulfúrico concentrado e aquecer até cerca de 70°C . Adicionar a solução de permanganato da bureta, com constante agitação até coloração rosa pálido, persistente por 15 segundos. A temperatura no final da titulação não deve ser menor que 60°C . Fazer 2 ou 3 provas e tomar a normalidade média.

$$N = \frac{(P / 67,01)}{V}$$

N = normalidade da solução de KMnO_4 procurada

V = volume da solução de KMnO_4 gasto na titulação

P = peso em mg do oxalato de sódio usado

6.1.4.4 Solução de permanganato de potássio 0,0125 N

Diluir a solução estoque de permanganato de potássio de modo a torná-la 0,0125 N.

O volume (V) da solução estoque a diluir no volume desejado será dado pela fórmula:

$$V = \frac{\text{volume desejado} \times \text{normalidade desejada}}{\text{normalidade da solução estoque}}$$

6.1.4.5 Solução de ácido oxálico 0,125 N

Pesar 7,890 g de ácido oxálico dihidratado. Transferir para balão volumétrico de 1000 mL, dissolver em água destilada e completar o volume.

5.4.6. Solução de ácido oxálico 0,0125 N

Diluir 100ml de solução de ácido oxálico 0,125 N para 1000 mL em balão volumétrico.

Titular com a solução de permanganato de potássio 0,0125 N e determinar o fator da solução.

6.1.5 Determinação

Colocar 100 mL de amostra em Erlenmeyer de 250 mL e adicionar 10 mL de ácido sulfúrico a 25% isento de matéria orgânica. Aquecer em banho-maria até início de fervura.

Adicionar, por meio de bureta, 10 mL de solução de permanganato de potássio 0,0125 N e continuar o aquecimento durante 10 minutos exatos, mantendo o líquido em leve fervura. Terminados os 10 minutos, retirar do banho e adicionar com bureta 10 mL de ácido oxálico 0,0125 N. Continuar adicionando a solução de permanganato de potássio 0,0125 N até reaparecimento da coloração rósea. A temperatura no final da titulação não deve ser menor que 60°C.

6.1.6 Cálculo

$$\text{mg de oxigênio consumido por litro} = V \times f$$

V = volume de solução de KMnO_4 0,0125 N gastos na titulação

f = fator da solução de ácido oxálico 0,0125 N

OBSERVAÇÃO: No caso de não ser possível analisar a amostra imediatamente, adicionar ácido sulfúrico isento de matéria orgânica até pH abaixo de 2,0. Com este tratamento a determinação poderá ser efetuada até 7 dias após a coleta.