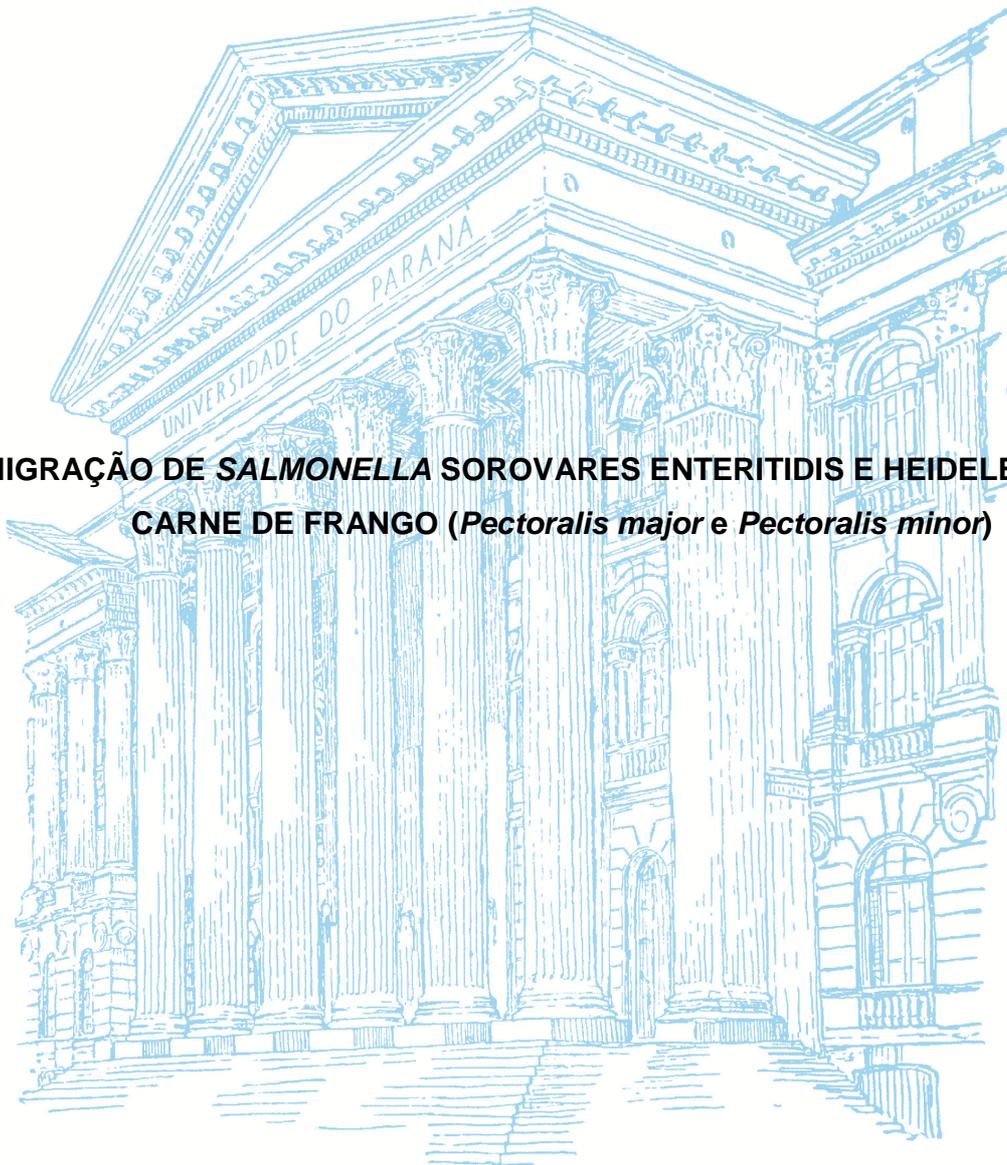


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAMILA TOZZO

**MIGRAÇÃO DE SALMONELLA SOROVARES ENTERITIDIS E HEIDELBERG EM
CARNE DE FRANGO (*Pectoralis major* e *Pectoralis minor*)**



PALOTINA

2016

KAMILA TOZZO

**MIGRAÇÃO DE *SALMONELLA* SOROVARES ENTERITIDIS E HEIDELBERG EM
CARNE DE FRANGO (*Pectoralis major* e *Pectoralis minor*)**

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

Orientador: Prof. Dr. Luciano dos Santos Bersot

PALOTINA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T757 Tozzo, Kamila
Migração de Salmonella Sovares Enteritidis e Heidelberg
em Carne de Frango (*Pectoralis major Pectoralis minor*)
/ Kamila Tozzo. - Palotina, 2016
89 p.

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

1. Carne de frango. 2. Deteriorantes. 3. Penetração
Bacteriana. 4. Salmonelose I. Bersot, Luciano dos
Santos. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título

CDU 637.54



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em CIÊNCIA ANIMAL
Código CAPES: 40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

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 KAMILA TOZZO, intitulada: "MIGRAÇÃO DE SALMONELLA SP. SOROVARES ENTERITIDIS E HEIDELBERG EM CARNE DE FRANGO (PECTORALIS MAJOR e PECTORALIS MINOR)", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Palotina, 31 de Março de 2016.

Prof LUCIANO DOS SANTOS BERSOT (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)

Prof LUCIANA BILL MIKITO KOTTWITZ (UNIOESTE)

Prof MAIRA SALOMAO FORTES (UFPR)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Kamila Tozzo, filha de Flávio Tozzo e Emilia Terezinha de Andrade Tozzo, nascida em 16 de julho de 1991 no município de Cascavel, estado do Paraná. Médica Veterinária formada no ano de 2013 pela Faculdade Assis Gurgacz. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na linha de pesquisa Microbiologia aplicada à Produção Animal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que na pessoa de Jesus Cristo revelou-se ao mundo, por conceder-me o dom da vida e as capacidades físicas e psíquicas para execução deste trabalho. Por guiar-me e consolar-me nos momentos de dificuldade e por fortalecer-me com a presença de Seu Santo Espírito.

Aos meus pais, Flávio e Emilia, por explicar-nos, a mim e a meu irmão, que o conhecimento é o maior tesouro que uma pessoa pode adquirir e que também é o único bem que jamais pode ser roubado. Agradeço não apenas por não medirem esforços para que recebêssemos o conhecimento formal nas escolas, mas principalmente por ensinar-nos o que as palavras não são capazes de expressar, o exemplo de vida de pessoas humildes, verdadeiras, justas e amorosas. Serei eternamente grata a vocês!

Ao meu esposo, Wander, pela paciência nos momentos de estresse e cansaço, pela compreensão quando precisei ausentar-me dos momentos de descanso e lazer, pelo abraço carinhoso que reconforta e renova as forças e pelas palavras de apoio, nem sempre doces, porém verdadeiras. Esta conquista não é minha, é nossa!

Aos demais familiares que torceram e rezaram por mim, de modo especial ao meu irmão Júnior, a minha avó Dilma e aos meus sogros, Vera e Walter.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PPGCA), de modo especial ao meu orientador, professor Luciano dos Santos Bersot. Agradeço-lhe por aceitar me orientar, por confiar em minha capacidade, por transmitir parte do seu vasto conhecimento e por engradecer o trabalho com suas correções e sugestões. Não posso esquecer também dos professores que de alguma forma me auxiliaram: Prof^o. Américo Garcez, Prof^a. Júlia Arantes Galvão, Prof^a. Katherinne Maria Spercoski, Prof^a. Lucélia Donatti, Prof^a. Luciana Kottwitz, Prof^a. Maíra Fortes, Prof^o. Milton Ronnau e Prof^o. Pablo Vasquez. Agradeço também aos técnicos Deonir Agustini, Fernando F. Giraldes, Paulo S. Santos e Rosana R. A. Maito e as secretárias do PPGCA, Margarida M. Silva e Elisângela L. Piovesan.

Aos meus colegas de mestrado, de modo especial a Ana Paula Perin, Ananiza G. P. Teles e Camila Lampugnani, pela amizade e apoio. Agradeço também as resistentes Kadigia Pegoraro e Mallú J. Sereno pela ajuda na execução do projeto. Aos demais colegas do Lacoma e outras pessoas das quais não citei o nome, mas que me ajudaram ao longo do mestrado.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN e ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR – CME por disponibilizarem seus equipamentos e estrutura para realização de etapas do presente trabalho.

Por fim, à Fundação Araucária, agência financiadora do projeto, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos. Muito obrigada!

RESUMO

Salmonella sp. é capaz de migrar para o interior da carne, sendo que as condições de estocagem e a presença de microbiota proteolítica podem influenciar nessa migração. No capítulo 1, realizou-se a pesquisa de *Salmonella* sp. em 21 peitos de frango, os quais foram segmentados em quatro partes, sendo elas pele, superfície, meio e interior. Subentendendo-se que a contaminação do frango ocorre na superfície, o estudo objetivou verificar a ocorrência de *Salmonella* sp. nos segmentos mais interiores do peito de frango e a possível influência de bactérias deterioradoras na presença de *Salmonella* sp. nesses segmentos. Como esperado, a porção com maior presença do patógeno foi a pele, seguida da superfície; os segmentos mais internos apresentaram uma porcentagem menor, porém foi detectada a bactéria. Não foi possível correlacionar a presença de bactérias deterioradoras com o aumento da prevalência de *Salmonella* sp. no interior da carne. No capítulo 2 objetivou-se avaliar a migração de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Heidelberg (SH) isoladas e adicionadas de psicotróficos proteolíticos (SEP e SHP) para o interior de blocos de carne de frango submetidos a diferentes condições de estocagem: pelos tempos 6, 12, 24, 48 e 168 horas e nas temperaturas 2, 7 e -30°C. Para quantificação bacteriana, as amostras foram divididas segmentos iguais, sendo o segmento A o mais superficial, B o intermediário e C o mais interno deles. Os resultados foram expressos em LogUFC/g e submetidos a análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste de SNK. *Salmonella* sp teve êxito na migração pela carne frango em todas as variações de tempo-temperatura e tratamentos, além disso, os dados sugerem que a migração foi progressiva até o tempo de 24h, porém decaiu com 48h. Em relação aos tratamentos, SEP teve contagens menores que os outros três tratamentos, os quais foram iguais entre si. Conclui-se que *Salmonella* sp. é capaz de migrar para o interior da carne em um curto período de tempo, mesmo em temperaturas de refrigeração, e que a presença de psicotróficos proteolíticos teve efeito inibitório na migração do sorovar S. Enteritidis.

Palavras-chave: Carne de frango, deteriorantes, penetração bacteriana, salmonelose

ABSTRACT

Salmonella sp. is able to migrate into the meat, and the storage conditions as well the presence of proteolytic microflora may influence this migration. In Chapter 1, has been realized the research with *Salmonella* sp. using 21 chicken breasts, which were segmented into four pieces, which were: skin, surface, middle and interior. On supposing that the chicken's contamination occurs on the surface, the study aimed to verify the occurrence of *Salmonella* sp. in the innermost segments of the chicken breast and the possible influence of bacterial spoilage with the presence of *Salmonella* sp. in these segments. As expected, the portion with increased pathogen was skin, then the surface; the innermost segments showed a smaller percentage, but the bacterium was detected. It was not possible to correlate the presence of spoilage bacteria with increased prevalence of *Salmonella* sp. inside the meat. In chapter 2, one aimed to evaluate the migration of *Salmonella* Enteritidis (SE) and *Salmonella* Heidelberg (SH) isolated and added of proteolytic psychrotrophic (SEP and SHP) to the inside of chicken meat blocks under different storage conditions: to five periods of storage: 6, 12, 24, 48 and 168 hours and under temperatures of 2°, 7° and -30° C. For a bacterial quantitation, the samples were divided into equal segments, the segment A is the most superficial, segment B the intermediate and C the innermost of them. The results were expressed as logUFC/g and subjected to analysis of variance (ANOVA) and means were compared by SNK test. Salmonellasp succeeded by migration inside of chicken' meat in all variations of time-temperature and treatments and, in addition, the data suggest that the migration was growing gradually until 24 hours, but declined after 48 hours. In relation to treatments SEP had lower scores than the other three treatments which were equal among them. One may conclude that *Salmonella* sp. is able to migrate into the meat in a short period of time, even under refrigerated temperatures, and the presence of proteolytic psychrotrophic had inhibitory effect on the migration of serotype S. Enteritidis.

Keywords: chicken meat, spoilage, bacterial penetration, salmonellosis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 <i>SALMONELLA</i> spp.: CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	11
2.2 HISTÓRICO DO APARECIMENTO DE <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS E PREVALÊNCIA DOS SOROVARES DE <i>SALMONELLA</i> EM AVES, ALIMENTOS E HUMANOS.....	15
2.3 MICROBIOTA DA CARNE DE FRANGO E A IMPORTÂNCIA DE <i>SALMONELLA</i> sp. NA CADEIA PRODUTIVA DE AVES E PARA OCORRÊNCIA DE DOENÇA EM HUMANOS.....	19
2.4 PENETRAÇÃO BACTERIANA EM CARNE E FATORES ASSOCIADOS.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. CAPÍTULO 1 – OCORRÊNCIA DE <i>SALMONELLA</i> EM CORTES DE PEITO DE FRANGO E QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DETERIORADORA.....	34
4.1 Introdução.....	35
4.2 Material e Métodos.....	36
4.3 Resultados e Discussão.....	38
4.4 Conclusões.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
5. CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE <i>SALMONELLA</i> HEIDELBERG E <i>S. ENTERITIDIS</i> EM PEITOS DE FRANGO.....	44
5.1 Introdução.....	45
5.2 Material e Métodos.....	47
5.2.1 Preparo dos Inóculos de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Heidelberg</i>	48

5.2.2 Preparo do Inóculo de Psicotróficos.....	49
5.2.3 Inoculação dos Micro-organismos.....	50
5.2.4 Quantificação das Bactérias Inoculadas.....	50
5.2.5 Microscopia Eletrônica e Histologia.....	51
5.3 Análises Estatísticas.....	52
5.4 Resultados e Discussão.....	53
5.5 Conclusões.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
6. CONCLUSÃO GERAL.....	68
APÊNDICES.....	68
APÊNDICE 1 – ESQUEMA EXPLICATIVO DO INÓCULO DE <i>SALMONELLA</i>	69
APÊNDICE 2 – ESQUEMA EXPLICATIVO INÓCULO DE PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS.....	70
APÊNDICE 3 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PREPARO E INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	71
APÊNDICE 4 – ESQUEMA EXPLICATIVO DA DIVISÃO, DILUIÇÃO E PLAQUEAMENTO DAS AMOSTRAS	72
APÊNDICE 5 – TABELA DO CONJUNTO DE DADOS BRUTOS.....	73
ANEXOS.....	89
ANEXO 1 – CERTIFICADO DE DOSIMETRIA.....	89

1. INTRODUÇÃO GERAL

Alimentos produzidos, armazenados ou manipulados de forma inadequada, principalmente os que contêm maior teor de umidade, como ovos, carnes, leite e derivados, podem veicular bactérias patogênicas para os seres humanos, as quais são tradicionalmente conhecidas como doenças transmitidas por alimentos (DTA). No entanto, esta terminologia precisa sofrer uma atualização já que o alimento não transmite doença, servindo somente de um veículo para os patógenos. As bactérias do gênero *Salmonella* são conhecidas por causarem problemas entéricos após o consumo de alimentos contaminados, principalmente ovos ou produtos a base de ovos e carne de frango (EFSA e ECDC, 2014; FINSTAD *et al*, 2012; CDC, 2013). As aves são hospedeiros naturais de *Salmonella* spp., no entanto, o aumento da demanda mundial de alimentos, a modernização da criação de avícola e industrialização de produtos a base de carne de frango favoreceram a disseminação desse patógeno na cadeia produtiva de aves comerciais. Atualmente, são conhecidos mais de 2.600 sorovares de *Salmonella*, porém nem todos são patogênicos para humanos, como *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, por exemplo. Dentre os sorovares patogênicos não-tifoidais, os de maior relevância são *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e também *S. Heidelberg*, devido ao aumento de surtos relacionados a esse sorovar na América do Norte nos últimos anos (GUIBOURDENCHE *et al*, 2010; EFSA e ECDC, 2014).

A carne de frango é frequentemente contaminada por *Salmonella* oriunda do trato gastrointestinal das aves, sendo que os principais pontos de contaminação na linha de abate são a evisceração, a escaldagem e o pré-resfriamento em *chiller*. É importante que o manipulador de alimentos tenha conhecimento da existência de bactérias na carne de frango, para que evite a contaminação cruzada de alimentos crus, utensílios de cozinha e das próprias mãos. Além disso, é importante atentar-se as informações da embalagem de produtos a base de frango, que trazem orientações a respeito do tempo, temperatura e modo de preparo adequado, com o intuito de garantir que células bacterianas abrigadas na superfície ou no interior da carne sejam eliminadas pelo processamento térmico (SCOTT *et al*, 2012).

Algumas bactérias são capazes de migrar para o interior da carne, sendo que alguns fatores extrínsecos como motilidade bacteriana, produção de enzimas proteolíticas, condições de estocagem, atmosfera da embalagem, e alguns fatores intrínsecos da carne, como integridade das fibras, pré ou pós-rigor interferem no grau e velocidade de migração bacteriana (WARSON *et al*, 2008).

Diante disso, o capítulo I objetivou avaliar a prevalência externa e interna de *Samonella* sp. em amostras de peitos de frango do comércio varejista e a sua correlação com a contagem de psicotróficos proteolíticos e *Pseudomonas* spp. presentes nessas amostras. Já no capítulo II, objetivou-se avaliar a migração de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg isoladas e adicionadas de psicotróficos proteolíticos para o interior de amostras de carne de frango submetidas a diferentes condições de estocagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SALMONELLA spp.: CARACTERÍSTICAS GERAIS

O nome *Salmonella* é resultado de uma homenagem ao veterinário bacteriologista Dr. Daniel Salmon, que em 1885 isolou a bactéria de intestino de suínos, na época designada como *Bacillus choleraesuis*, sendo que em 1900 o pesquisador Lignières sugeriu o nome *Salmonella*, em homenagem ao Dr. Salmon e, desde então, a nomenclatura sofreu diversas alterações.

Em 1932, devido ao avanço das provas sorológicas, reconheceu-se o esquema Kauffman-White, sendo que em 1987 os pesquisadores Le Minor e Popoff do Instituto Pasteur, fizeram a Comissão Judicial do Comitê Internacional de Sistemática de Bactérias uma proposta de alteração taxonômica. Primeiramente a proposta foi recusada pela Comissão Judicial, sendo aceita recentemente, em 2005. A partir de 2007 o “esquema Kauffman-White” passou a ser denominado esquema Kauffman-

White-Le Minor, devido a grande contribuição do pesquisador Le Minor na descoberta de novos sorovares (GARRITY *et al*, 2004; TINDAL *et al*, 2005).

A nomenclatura oficial para o gênero *Salmonella*, segundo o esquema Kauffman-White-Le Minor, admite duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (V). A espécie *Salmonella enterica* é dividida em 6 subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I); *S. enterica* subsp. *salamae* (II); *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa); *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb); *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV); *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (GARRITY *et al*, 2004; CDC, 2011). Em 2010 foram catalogados 2.610 sorovares de *Salmonella*, número atualizado em 2014 (quadro 1) pelo Instituto Pasteur para 2.659 (Guibourdenche *et al*, 2010; Issenhuth-Jeanjean *et al*, 2014). Convencionou-se que para facilitar a nomenclatura dos sorovares, pode-se ocultar a subespécie, escrevendo-se apenas o gênero e o sorovar; dessa forma, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis, pode ser escrita na forma contraída *Salmonella* Enteritidis, sendo que apenas o gênero deve estar em itálico e o sorovar deve iniciar com letra maiúscula (POPOFF *et al*, 2003, 2004; GUIBOURDENCHE *et al*, 2010).

Quadro 1. Número de sorovares catalogados para cada espécie e subespécie de *Salmonella* em 2010 e 2014

Espécie/Subespécie	Nº de sorovares (2010)	Nº de sorovares (2014)
<i>S. entérica</i>		
subsp. <i>enterica</i>	1.547	1.586
subsp. <i>salamae</i>	513	522
subsp. <i>arizonae</i>	100	102
subsp. <i>diarizonae</i>	341	338
subsp. <i>houtenae</i>	73	76
subsp. <i>indica</i>	13	13
<i>S. bongori</i>	23	22
Total	2.610	2.659

Fonte: Adaptado de Guibourdenche *et al* (2010) e Issenhuth-Jeanjean *et al* (2014).

A classificação dos sorovares baseia-se na associação de antígenos somáticos (O) e flagelares (H), identificados através de reação antígeno-anticorpo. Os antígenos somáticos são compostos por fosfolipídeos e polissacarídeos, conferindo-lhes resistência a ácido, álcool e temperaturas altas; são essenciais para virulência bacteriana. Os antígenos de constituição flagelar são termolábeis, devido a sua constituição proteica. A estrutura completa é formada por corpo basal, segmento de união e filamento; apenas o filamento, constituído de flagelina, é utilizado na sorotipificação (DOYLE *et al*, 1997). Na maioria dos sorovares os antígenos flagelares ocorrem em duas fases, porém alguns são monofásicos, como *S. Enteritidis* e *S. Typhi*. Alguns sorovares ainda possuem antígenos capsulares, sendo o antígeno Vi o mais importante deles, presente em *S. Typhi*, *S. Paratyphi C*, algumas cepas de *S. Dublin*, *S. Heidelberg*, dentre outros (CAFFER e TERRAGNO, 2001).

Os sorovares podem ser divididos em grupos identificados por letras, de acordo com a presença dos antígenos somáticos "O". O grupo A, por exemplo, é formado por sorovares que possuem o antígeno O2, já o grupo B por sorovares com O4, e assim por diante. No entanto, com a crescente diversidade de sorovares a separação por letras tornou-se inviável, preferindo-se adotar apenas o número do antígeno. Portanto, o que antes era denominado de A, por conter O2, agora se denomina apenas 2, já referindo-se a presença do antígeno O2.

Além disso, os antígenos flagelares de primeira fase são representados por letras minúsculas e os de segunda fase por números, separados por "dois pontos" com algumas exceções. Quando houver o antígeno Vi, este deve ser representado por números entre colchetes. Dessa forma, a fórmula antigênica, utilizando-se *Salmonella* Enteritidis como exemplo, apresenta-se da seguinte forma: 1,9,12: g,m: - (ausência de antígeno flagelar de segunda fase). Como segundo exemplo, demonstra-se a fórmula antigênica de *Salmonella* Heidelberg: 1,4,[5],12: r: 1,2. O número "5" entre colchetes representa a presença do antígeno capsular Vi, além disso, diferentemente da fórmula anterior, essa contém antígenos flagelares de segunda fase, representados pelos números "1" e "2" após a letra "r" (GRIMONT e WEILL, 2007).

Salmonella está amplamente distribuída na natureza, sendo o trato gastrointestinal de humanos e animais os seus reservatórios primários. Pertencem à

Família Enterobacteriaceae, são da ordem *Enterobacteriales*, da classe *Gamaproteobacteria* e do filo *Proteobacteria* (BMSAB). São bacilos pequenos, com cerca de 2 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro, Gram-negativos e não formadores de esporos. São mesófilas com temperatura ótima de crescimento de 37°C, e o pH ideal próximo da neutralidade, variando entre 4 e 9. São anaeróbias facultativas, não fermentadoras de sacarose e, em sua maioria, não fermentadoras de lactose (JAY, 2000). A infecção ocorre através da ingestão de água ou alimentos contaminados com uma quantidade significativa de bactérias, sendo que o limítrofe para infecção dependerá da susceptibilidade do hospedeiro. *Salmonella* é classificada como enterobactéria, por provocar sintomatologia entérica nos hospedeiros infectados.

Salmonella pode causar três formas de enfermidades em humanos, a doença gastrointestinal, causada por bactérias não tifoidais como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, a febre entérica, provocada por *Salmonella* Paratyphi A, B e C e a febre tifoide, provocada por *Salmonella* Typhi. A forma gastrointestinal caracteriza-se pelo consumo de alimentos ou água contaminados, os quais veiculam o patógeno oriundo do trato intestinal dos animais, presente no alimento devido alguma falha na cadeia produtiva ou no processamento do mesmo. A sintomatologia é branda em pessoas saudáveis, provocando náuseas, diarreia, dor abdominal, vômito, febre e cefaleia. Os sintomas iniciam dentre 12h e 72h após a exposição e pode durar até cinco dias. A mortalidade é considerada baixa, no entanto pessoas com imunidade comprometida, como idosos, crianças e enfermos, podem ter agravamento dos sintomas como desidratação, artrite, septicemia e morte (DOYLE *et al.*, 1997; FDA, 2012; SHINOHARA, 2008).

A febre tifoide apresenta sintomatologia grave, com mortalidade aproximada de 10% em pessoas não tratadas. A principal diferença dessa doença para a febre entérica e para as gastroenterites comuns é a existência do agente etiológico apenas em humanos, dessa forma, para infectar-se com as salmonelas tifoidais é necessário ingerir água ou alimento contaminado com dejetos humanos, como vegetais irrigados com água contaminada ou alimentos manipulados por portadores da bactéria. O período de incubação é longo, podendo variar de uma semana até dois meses, além disso, algumas pessoas tornam-se portadoras e, conseqüentemente, disseminadoras do

patógeno. Os sintomas são febre alta, letargia, dor de cabeça, diarreia ou constipação, perda de apetite e, em alguns casos, aparecimento de erupções e manchas vermelhas na pele. As complicações são semelhantes as que ocorrem nas gastroenterites, porém são mais frequentes (BRASIL, 2008; FDA, 2012). A febre entérica tem período de incubação de 6h às 48h e ocorre devido ao consumo água e alimentos contaminados. Possui sintomatologia semelhante à febre tifoide, porém mais branda, com duração média de três semanas (DOYLE *et al.*, 1997; SHINOHARA, 2008).

O grupo *S. enterica* subsp. *enterica* é o de maior importância em alimentos, tendo o sorovar *S. Enteritidis* como o principal causador de DTA em humanos a partir da ingestão, principalmente, de carne e ovos contaminados. A maioria é móvel, devido à presença de flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Esses sorovares imóveis são de pouca importância para saúde pública, porém apresentam patogenicidade para aves, tendo grande importância econômica e sanitária na criação de aves comerciais (BACK, 2010). Em contrapartida, *Salmonella* *Enteritidis* tem pouco impacto para produtividade das granjas, porém apresenta-se como o principal sorovar causador de surtos alimentares a partir da década de 90, no Brasil (SILVA e DUARTE, 2002). *S. Kentucky* e *S. Heidelberg* têm sido os principais sorovares isolados a partir de aves e seus subprodutos nos Estados Unidos e no Canadá entre os anos 2000 e 2012 (FOLEY, 2011; PHAC, 2014). Em humanos, os principais sorovares isolados na última década foram: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Newport* e *S. Javiana* (ANVISA, 2012; EFSA e ECDC, 2014; PHAC, 2014; CDC, 2015).

2.2 HISTÓRICO DO APARECIMENTO DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS E PREVALÊNCIA DOS SOROVARES DE *SALMONELLA* EM AVES, ALIMENTOS E HUMANOS

A partir de 1980 *S. Enteritidis* provocou diversos surtos humanos em países da Europa e, principalmente, nos Estados Unidos, tendo ovos ou produtos à base de ovos

como fonte comum dos surtos. Os países com avicultura desenvolvida enfrentavam um grave problema de saúde pública, o qual não demorou a afetar o Brasil, que importava material genético desses países (CDC, 1990; SILVA e DUARTE, 2002). Segundo Taunay *et al* (1996), entre 1950 e 1990 *S. Enteritidis* tinha pouquíssima importância para saúde pública, o sorovar de maior prevalência era *S. Typhimurium*. Na década de 90, a prevalência de *S. Enteritidis* subiu de 1,2 para 64,9% em amostras humanas.

Na época, algumas hipóteses foram traçadas na tentativa de explicar o aumento repentino da prevalência do sorovar *Enteritidis*, dentre elas as práticas modernas de criação de aves, como alta densidade animal, melhoramento genético e nutrição padronizada, no entanto essa hipótese foi derrubada pelo fato de que a prevalência de outros sorovares, como *S. Typhimurium*, permanecia constante nos Estados Unidos e na Europa. Outra hipótese referiu-se à expansão de uma única cepa virulenta de *S. Enteritidis*, porém os surtos foram associados a diferentes cepas já existentes. Diante disso, a hipótese melhor aceita foi que os programas de controle para redução de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* adotados a partir da década de 30, com erradicação desses sorovares em granjas comerciais dos Estados Unidos e Grã-Bretanha em 1970, liberaram um nicho ecológico na criação de aves, que passou a ser ocupado por *S. Enteritidis* (BÄUMLER *et al*, 2000).

Esse fato pode ser explicado pela existência de imunidade cruzada entre os sorovares em questão. *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* possuem os mesmos antígenos de superfície, O9 e O12. A circulação de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* nos plantéis avícolas conferia imunidade às aves, através da produção de anticorpos contra os antígenos O9 e O12. Uma vez extintos os sorovares *Gallinarum* e *Pullorum*, as aves perderam os anticorpos reativos a O9 e O12, momento no qual o sorovar *Enteritidis* estabeleceu-se na criação de aves comerciais. Além disso, a constância da prevalência de *S. Typhimurium* pode ser explicada por possuir fórmula antigênica diferente dos demais, formada pelos antígenos O4, O5 e O12 (BÄUMLER *et al*, 2000).

Em 1994 *Salmonella Enteritidis* tornou-se o sorovar mais prevalente isolado de fontes humanas nos Estados Unidos. Em 2006 foi considerada a segunda causa mais comum de infecções, sendo responsável por 16,6% dos casos. Da mesma forma que, possivelmente, *S. Enteritidis* ocupou o nicho ecológico de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*

existe a preocupação frequente a respeito de qual sorovar pode ocupar o nicho ecológico de *S. Enteritidis*, o qual tem reduzido sua prevalência ano a ano devido a programas de controle e vacinação de matrizes em vários países. *S. Kentucky* e *S. Heidelberg* têm sido os principais sorovares isolados a partir de aves e seus subprodutos nos Estados Unidos na última década. *S. Kentucky*, diferentemente de *S. Heidelberg*, não é patogênico para humanos. *S. Heidelberg* é um sorovar com bastante representatividade em isolados de humanos, com capacidade de provocar doença mais invasiva quando comparado a *S. Enteritidis* (FOLEY, 2011). O “Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance” demonstrou que os principais sorovares de *Salmonella* isolados de carne de frango entre 2003 e 2012 no Canadá foram *S. Heidelberg*, *S. Kentucky* e *S. Enteritidis*. Existe a crescente preocupação no que se refere à resistência de *S. Heidelberg* ao ceftiofur, isso se deve ao fato de que bactérias resistentes ao ceftiofur são frequentemente resistentes a ceftriaxona, droga de escolha para o tratamento de salmoneloses graves e outras infecções bacterianas de origem alimentar em mulheres grávidas e crianças. Em 2012, em todo o Canadá, 27% dos isolados humanos de *S. Heidelberg* apresentaram resistência ao ceftiofur e a ceftriaxona, sendo que no oeste do país a porcentagem de cepas resistentes chegou a 51% (PHAC, 2014).

O sorovar *Enteritidis* foi o mais prevalente nos Estados Unidos em humanos no ano de 2013, com 1.285 isolados (19%). Em segundo lugar ficou *S. Typhimurium*, com 938 isolados (14%), seguida de *S. Newport* (11%) e *S. Javiana* (10%); *Salmonella Heidelberg* ficou em sexto lugar, com prevalência de 6%. Além disso, 634 pessoas adoeceram ao consumir carne de frango contaminada com *S. Heidelberg*, 38% dos doentes precisaram ser hospitalizados (CDC, 2014). Em 2014 os sorovares de maior prevalência em humanos também foram *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Newport*, e *S. Javiana*, respectivamente, sendo que 15,45% das doenças veiculadas por alimentos foram provocadas por *Salmonella* spp. Além disso, esse patógeno foi responsável por 29% das hospitalizações e 0,4% das causas de morte em 2014 (CDC, 2015).

Segundo a European Food Safety Authority, o número de casos de salmonelose tem diminuído significativamente na Europa, devido a programas de controle adotados, porém em 2011 as bactérias do gênero *Salmonella* ainda eram a causa mais prevalente

de surtos, sendo responsáveis por 26,6% do total de surtos alimentares. O número de casos confirmados em 2012 foi 91.034, 4,7% menos casos que em 2011. Os sorovares mais frequentemente isolados de humanos foram *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Infantis*, respectivamente. Os produtos mais frequentemente contaminados por *Salmonella* foram carne de frango, carne de peru, carne suína e carne bovina, respectivamente; ovos, frutas e vegetais tiveram baixa proporção de contaminação (EFSA e ECDC, 2014).

No Brasil, entre os anos de 2004 e 2006 foram isoladas 250 cepas de *Salmonella* oriundas de carne de frango, o sorovar com maior prevalência foi *Salmonella* Enteritidis com 48,8% do total de isolados, seguido de *Salmonella* Infantis, com 7,6%, *Salmonella* Typhimurium com 7,2% e *Salmonella* Heidelberg com 6,4% (ANVISA, 2012). Além disso, a Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VET-DTA) afirma que *Salmonella* spp. foi responsável por aproximadamente 38% dos surtos alimentares ocorridos no país no período de 2000 a 2014, tendo sido o principal patógeno causador de DTA.

No estado do Paraná, entre 1999 e 2008 foi realizada a observação de surtos de *Salmonella* sp. Dos 286 surtos, 254 foram encaminhados para diagnóstico laboratorial no LACEN (Laboratório Central do Estado) e desses, 37 foram confirmados para *Salmonella* spp. Dos 399 municípios do Paraná, 52 notificaram surtos, sendo que os municípios com maior ocorrência foram Curitiba (31,5%), Francisco Beltrão (6%), Cascavel (5,2%) e Toledo (3,8%). Quanto aos alimentos associados, 45% dos surtos foram causados por alimentos a base de ovos, 34,8% por carne e derivados e 20,2% por alimentos variados (queijos, saladas, sorvetes e outros). Quanto ao local dos surtos, foi encontrado o mesmo resultado descrito no trabalho realizado em Santa Catarina por LUCA e KOERICH (2009), a maioria dos surtos ocorreu em domicílios. O sorovar mais prevalente foi *S. Enteritidis*, que apareceu em mais de 80% das amostras (KOTTWITZ *et al*, 2010).

No estado de São Paulo, entre 2005 e 2007 foram analisados 806 suabes de arrasto de granjas avícolas, 22 amostras foram confirmadas para *Salmonella* spp., sendo *S. GIVE* estava presente 50% das amostras, seguida de *S. enterica* subsp. *enterica* – cepa rugosa, com 18,2%, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Infantis com

9,1% e *S. Rissen* e *S. Senftenberg* com 4,5% (FILHO, 2009). Na prevalência de carcaças de frango resfriados do estado de São Paulo entre 2000 e 2010, *S. Enteritidis* ocupa o primeiro lugar, com 49,4%, seguida de *S. Albany* (15,7%) e *S. Infantis* (11,2%). *S. Heidelberg* aparece em 6º lugar, com prevalência de 3,4% (CARDOSO, 2015).

Já no oeste do Paraná em 2014, um estudo descreveu a prevalência de sorovares de *Salmonella* sp. em 342 suabes de arrasto provenientes de granjas de corte, dentro os quais 11,4% foram positivos para *Salmonella* spp. O sorovar *S. Heidelberg* teve maior prevalência, com 12,82%, seguida de *S. Mbandaka* e *S. Newport*, ambas com porcentagem de 10,25%. *S. Enteritidis*, juntamente com outros três sorovares, apresentou prevalência de 7,7% (PANDINI *et al*, 2014).

A alternância de sorovares ao longo das décadas é um assunto bastante delicado, logo existem diversas teorias a respeito dos motivos da mudança de prevalência de sorovares em isolados animais e humanos. Não existe um consenso a respeito desse tema, apenas algumas hipóteses, como a da imunidade cruzada, citada anteriormente no presente trabalho.

2.3 MICROBIOTA DA CARNE DE FRANGO E A IMPORTÂNCIA DE *SALMONELLA* spp. NA CADEIA PRODUTIVA DE AVES E PARA OCORRÊNCIA DE DOENÇA EM HUMANOS

A produção mundial de carne de frango, em 2014, foi de 86.077 milhões toneladas, sendo que o Brasil foi responsável por 12.691 milhões de toneladas, ocupando o terceiro lugar de maior produtor mundial. Além disso, do volume total de frangos produzido pelo país, 67,7% foi destinado ao consumo interno, e 32,3% para exportações. Com isto, o consumo *per capita* de carne de frango atingiu 42,78 quilos por pessoa (ABPA, 2015). Diante desse cenário de ampla produção e consumo de carne frango e ocorrência de DTA, a biosseguridade na criação de aves comerciais juntamente com a qualidade higiênico-sanitária da carne de frango e suas consequências para saúde pública devem ser alvos de discussão.

Segundo Jay (2000), a microbiota da carne de frango, formada principalmente por bactérias Gram-negativas, reflete o ambiente de abate e as condições de processamento, além da pressão de infecção nas etapas anteriores da cadeia produtiva. As bactérias deterioradoras Gram-positivas mais frequentes na carne de frango pertencem aos gêneros *Enterococcus* e *Lactobacillus*, enquanto que os deterioradores Gram-negativos mais frequentes são dos gêneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Pseudomonas* e *Psychrobacter*.

Algumas bactérias da microbiota presente na carne de frango são capazes de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração (7°C), as quais são conhecidas como psicrotróficas (JAMES, S.; JAMES, C., 2014). Dentre os patógenos psicrotróficos com importância em carne de aves estão os gêneros *Listeria* e *Staphylococcus*. Apesar de *Salmonella* não ser tradicionalmente psicrotrófica, algumas cepas possuem a capacidade de crescimento em temperaturas baixas (BANTING, 1991). Já no que diz respeito a deteriorantes psicrotróficos, o gênero de maior relevância é *Pseudomonas* (GALARZ et al, 2010).

Sabe-se que *Salmonella* é frequentemente encontrada em carne de frango e produtos a base de frango (EFSA e ECDC, 2014; FINSTAD *et al*, 2012; CDC, 2013). Dessa forma, medidas preventivas devem ser preconizadas em toda a cadeia produtiva, desde o controle sanitário na produção até o emprego de medidas de controle higiênico-sanitário na indústria. Segundo Hermann (2012), a contaminação das aves por *Salmonella* spp. ocorre via oral, as bactérias instalam-se na parede intestinal, multiplicam-se e são eliminadas pelas fezes. Essas fezes, portanto, contaminam o ambiente e outras aves do lote, assim se estabelece a disseminação horizontal; porém, quando o aparelho reprodutor ou o ovo é contaminado, o patógeno pode ser transmitido para a progênie, sendo essa forma de disseminação conhecida como contaminação vertical, a qual estabelece a contaminação progressiva de toda a cadeia produtiva.

A salmonelose é um dos principais problemas de saúde pública, devido a sua fácil transmissão, através da ingestão de alimentos ou água contaminados, e dificuldade de controle, principalmente no que diz respeito à cadeia avícola. Diante disso, a salmonelose é uma das quatro doenças do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), no qual o Ministério da Agricultura (MAPA) faz fiscalizações quanto à

presença de quatro sorovares de *Salmonella*: *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, apatogênicas para humanos, porém de grande importância econômica e sanitária na criação de aves; e *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, causadoras de DTA. Apesar de o PNSA controlar apenas esses sorovares, existem diversos outros sorovares de importância, principalmente, para saúde pública (BRASIL, 2009).

As aves podem albergar *Salmonella* spp. e introduzi-la na a indústria de processamento, principalmente através da penas, pés e órgão digestivos; o papo, por exemplo, é bastante associado à fonte de contaminação da carcaça, devido à facilidade de ruptura. Além disso, o processo de depenagem das aves também tem grande importância na contaminação cruzada das carcaças, isso sugere que a aplicação de medidas de controle no frango vivo tem grande correlação com a qualidade final do produto. A contaminação cruzada da carcaça pode ocorrer também na escaldagem, retirada da cabeça, evisceração e pré-resfriamento. Sabe-se que, apesar das ferramentas de controle adotadas pelas indústrias, como Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), não é possível eliminar essa bactéria durante o processamento da carne de frango (SCOTT *et al*, 2012).

Salmonella sp. deve estar ausente nos alimentos, conforme Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001a), porém não existe parâmetro para carne de frango, devido a dificuldade de controle desse patógeno na cadeia avícola e, conseqüentemente no produto final. O Programa de Redução de Patógenos, instituído pela Instrução Normativa nº 70 de 06 de outubro de 2006 do MAPA, que tem como objetivo monitorar a prevalência de *Salmonella* em produtos avícolas admite que em um ciclo de amostragem, composto por 51 carcaças de frango, no máximo 12 amostras sejam positivas. Além disso, a resolução RDC nº 13 de 02 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001b), exige que carne de aves e seus miúdos crus contenham em suas embalagens instruções a respeito do preparo e conservação desses produtos, alertando para o risco de contração de doença em casos de manipulação e/ou preparo inadequados.

A redução de doenças humanas causadas pela contaminação de alimentos, em especial a salmonelose, é um objetivo de saúde pública em todo o mundo. Algumas estratégias de gestão visam elucidar o consumidor a respeito do consumo de carne e

ovos para minimizar os surtos ocorridos por falhas no preparo do alimento, para isso é necessário conhecer as duas principais linhas de ocorrência de DTA: (a) consumo de alimento cru ou mal cozido e (b) contaminação cruzada. A última caracteriza-se pela contaminação de superfícies, mãos e alimentos crus, como saladas, pelo contato com carnes cruas. A falha no cozimento (“undercooking”) ocorre devido ao desconhecimento das instruções de preparo e falta de métodos eficazes para verificação da temperatura interna da carne em cozinhas domiciliares (LUBER, 2009).

Todos esses fatores, como a ocorrência de surtos em domicílios, contaminação cruzada de alimentos e utensílios e preparo inadequado de alimentos ocorrem devido a hábitos errados no preparo das alimentações e falta de acesso a informações de hábitos de higiene, sendo que a educação sanitária, partindo da educação infantil, é um ponto chave para correção dessa deficiência de conhecimento e consequente redução de doenças transmitidas por alimentos (DTA).

2.4 PENETRAÇÃO BACTERIANA EM CARNE E FATORES ASSOCIADOS

Salmonella habita o trato gastrointestinal das aves, sendo que a pressão de infecção está diretamente relacionada com as condições de criação desses animais. A pele e o trato gastrointestinal são as porções mais contaminadas e podem dissipar o patógeno através da planta frigorífica. A contaminação, primeiramente, afeta a superfície da carcaça e a partir dessa contaminação superficial é que ocorre a contaminação interna, ou seja, da superfície para o interior das massas musculares.

Inicialmente, sabe-se que a contaminação interna tem menor relevância quando comparada a contaminação superficial que atinge contagens bacterianas maiores, tendo grande importância na transferência de bactérias para outros alimentos, como saladas cruas, e para utensílios de cozinha e mãos do manipulador, caracterizando a contaminação cruzada. No entanto, mesmo em pequenas quantidades, as bactérias são capazes de penetrar para o interior da carne, locais conhecidos como “cold-points”

que, na ocorrência de um tratamento térmico mais brando podem proporcionar um sub-processamento permitindo a sobrevivência de *Salmonella* (LUBER, 2009).

Roccatto *et al* (2015) realizaram diferentes tratamentos térmicos, semelhantes aos realizados em cozinhas domiciliares, em produtos a base de carne de aves (linguiças, hambúrgueres, etc.) contaminados artificialmente com *Salmonella* Typhimurium. Concluíram que o preparo inadequado dos produtos mantem células viáveis da bactéria em seu interior e que o critério mais utilizado em domicílios, o de observação visual do ponto de cozimento, é inadequado devido a sua subjetividade.

Para melhor compreensão dos fatores que interferem na migração bacteriana pela carne, é importante compreender a estrutura da carne de frango, a qual é formada por músculo estriado esquelético, envolto por uma camada de tecido conjuntivo chamada de epimísio. Alguns septos do epimísio prolongam-se até a parte interna do músculo para envolver os feixes musculares, esse tecido conjuntivo passa a se chamar perimísio. O endomísio, por sua vez, prolonga-se a partir do perimísio para formar uma fina camada de tecido conjuntivo, que envolve cada fibra muscular individualmente. Por último, a membrana celular é chamada de sarcolema (figura 1).

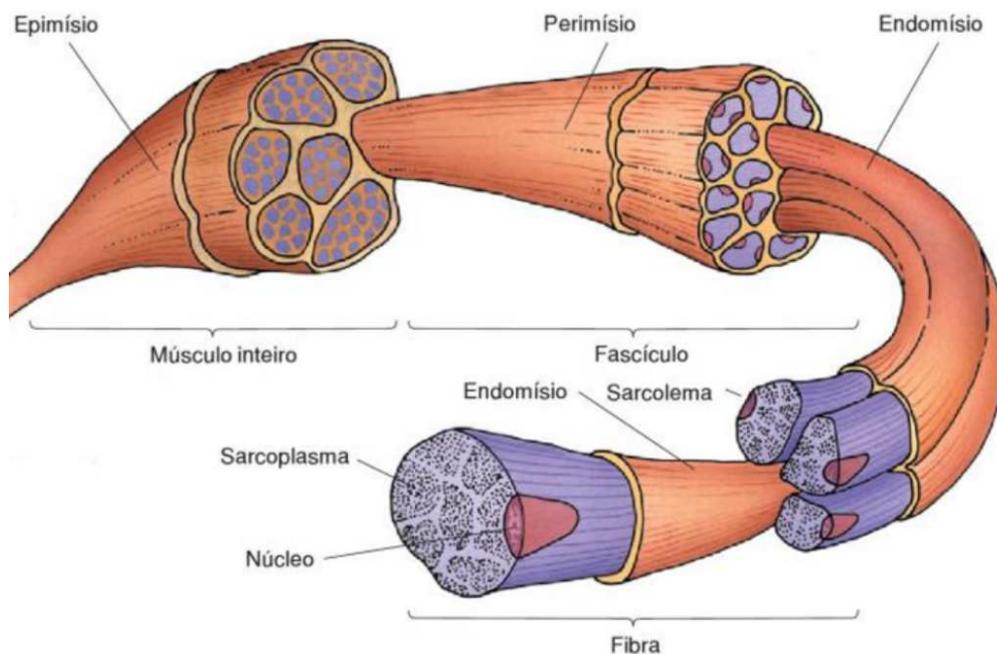


Figura 1. Representação macroscópica do tecido muscular estriado esquelético. Fonte: Adaptado de Gartner e Hiatt, 2007.

Técnicas de conservação da carne podem alterar a estrutura dos tecidos, dentre elas está o congelamento, uma técnica de armazenamento de carnes bastante empregada por suas vantagens, como dilatação do prazo de validade e inibição da multiplicação microbiana. A carne pode ser congelada pelo congelamento rápido, o qual reduz as alterações estruturais no tecido, ou pelo congelamento lento, que forma grandes cristais de gelo, os quais rompem membranas celulares, paredes e estruturas internas, tornando a carne mais exposta a fatores adversos, como por exemplo, bactérias (JAY, 2000; LAWRIE, 2005).

A pesquisa de fatores que interferem na penetração de bactérias em carnes não é recente, existem alguns trabalhos da década de 70 que tratam desse assunto. Elmoossalami e Wassef, em 1971, descreveram a taxa de penetração de algumas bactérias, dentre elas *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*, em carne intacta. Foi demonstrado que a temperatura, o tempo de armazenamento e o tipo bacteriano interferem na penetração, *S. Enteritidis*, por exemplo, foi capaz de penetrar 5 cm da carne num período de 12 horas a 30°C e 15cm num período de 36 horas, na mesma temperatura. A 7°C e a -10°C a migração foi mais lenta, 3 cm em 12h e 10 cm em 36h. Quando comparada a outras bactérias, *Salmonella* sp. demonstrou ter maior eficiência na penetração em carnes.

Gill e Penney descreveram em 1977 a importância da produção de enzimas proteolíticas para infiltração bacteriana através da carne, que ocorre devido à degradação do endomísio, ligações inferiores das fibras musculares. O endomísio é uma estrutura delicada, enquanto que a proteína das fibras musculares é densa, por isso, o endomísio é degradado mais rapidamente pelas proteases, permitindo a invasão da bactéria por essa rota. Para esses autores, a produção de proteases era um fator limitante para que as bactérias conseguissem adentrar ao tecido, no entanto, estudos posteriores demonstraram que, apesar de sua importância, não é uma condição essencial. A liberação de enzimas proteolíticas pelas bactérias ocorre apenas no final da fase logarítmica de crescimento, quando a carne está num estágio avançado de deterioração, dessa forma a penetração bacteriana baseada nesta premissa ocorreria apenas em carnes deterioradas (GILL e PENNEY, 1977).

Em 1982, os mesmos autores publicaram um trabalho alegando que o endomísio era a provável rota de migração bacteriana e alvo das proteases, porém ainda eram necessários mais estudos sobre a estrutura da carne para delinear melhor esse trajeto (GILL e PENNEY, 1982). O trabalho citado anteriormente foi uma resposta ao questionamento feito por Sikes e Maxcy (1980), os quais afirmaram que a penetração ocorre devido a alterações estruturais da carne, como rupturas do sarcolema e abertura de canais, devido ao congelamento (formação de cristais de gelo) e descongelamento (cristais de gelo são descongelados, formando canais) e ao cozimento.

Posteriormente, estudo realizado por Gill *et al* (1984) comparou as alterações estruturais da carne que poderiam interferir na penetração de bactérias; os fatores avaliados foram as diferenças estruturais da carne no pré-rigor e no pós-rigor, frente a diferentes soluções fixadoras: hipo, iso e hipertônicas. A pressão osmótica da solução fixadora teve um efeito pronunciado na estrutura do músculo no pré-rigor. Efeito semelhante ocorreu no pós-rigor, porém a interrupção dos elementos da membrana plasmática das células associada ao aumento da osmolaridade provocou o encolhimento das fibras musculares. Esse encolhimento provoca lacunas nos elementos contráteis das células, ocorrendo liberação de proteínas sarcoplasmáticas e queda do pH, fator que reduz a resistência do músculo frente à invasão bacteriana e favorece a migração. Foi possível visualizar a penetração de *Pseudomonas fluorescens* por essas lacunas em músculo no pós-rigor incubado a 5°C por cinco dias.

Alguns anos depois, Thomas *et al* (1987), concluiu que na inoculação de culturas puras, apenas bactérias móveis, são capazes de penetrar na carne; assim, a capacidade de a bactéria produzir enzimas proteolíticas não é um requisito absoluto para penetração na carne, a qual depende também do fator motilidade; mostrando que a carne de frango pode apresentar poucas barreiras para penetração de bactérias móveis, como *Salmonella*. Além disso, a proteólise acelera a migração bacteriana, devido à hidrólise sarcoplasmática de proteínas, dessa forma, quando são inoculadas associações de bactérias proteolíticas e não proteolíticas, as bactérias proteolíticas facilitam a entrada de bactérias não proteolíticas.

Alguns pesquisadores utilizaram um corante azul (Blue Lake) para simular se a pressão da água na lavagem de carcaças bovinas poderia carrear as bactérias da

superfície para o interior da carne. Concluíram que o aumento da pressão da água na aspensão de carcaças pode aumentar a introdução de bactérias para o interior da carne, como aconteceu com as partículas do corante. Não houve diferenças na penetração do corante em carnes frescas e carnes descongeladas (ANDERSON *et al*, 1992; ZUNIGA *et al*, 1991).

Em estudo realizado com carne suína inoculada com *Pseudomonas* spp. e armazenada a 4°C, observou-se a infiltração dessas bactérias na carne através de imagens de microscopia eletrônica; a visualização foi possibilitada pela adição do corante laranja de acridina. Formou-se uma camada de colônias na superfície da carne, demonstrando que esse é o local mais adequado para a atividade deterioradora dessas bactérias (DELAQUIS *et al*, 1992). Gupta *et al* (1992) ao estudar a capacidade de penetração de *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fragi*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei*, a 37°C em carne de aves, demonstrou que as duas primeiras tiveram maior êxito em adentrar a carne (3cm em 24h), seguidas do *Lactobacillus plantarum* (2cm em 48h). *Lactobacillus casei* não penetrou na carne, tal resultado foi explicado pela ausência de atividade proteolítica.

Escherichia coli geneticamente modificada, marcada com “green fluorescent protein” (GFP), foi inoculada em carne bovina para visualização, em microscopia eletrônica de varredura, da penetração bacteriana em função de um tratamento tecnológico para amaciamento de carnes através da aplicação de ondas de choque hidrodinâmico (HSW). A carne tratada com HSW teve uma taxa de migração de 0,3cm, maior que o controle, porém não significativo estatisticamente. Observou-se, também, que a migração ocorreu pelos envoltórios das fibras (LORCA, 2002). Trabalho realizado por Gill *et al* (2008), demonstrou que a tenderização mecânica, injeção de salmoura por meio de agulhas, destrói as fibras da carne e possibilita a migração de *Listeria innocua*, que sabidamente acontece pelo tecido conjuntivo de revestimento, pelo interior das fibras do tecido muscular esquelético.

Além dos fatores apresentados, outros podem também interferir na migração bacteriana, como a disponibilidade de água, a orientação das fibras e a atmosfera da embalagem do alimento. O trabalho realizado por Warson *et al* (2008), teve o objetivo de avaliar a interferência do vácuo na migração bacteriana em carne marinada de peito

de peru. A penetração direcional de *Salmonella* sp., em 3 cm, em condições atmosféricas levou 20h, enquanto que a vácuo levou 20 minutos. Além da interferência do vácuo, a marinada também pode ter interferido na penetração bacteriana. Uma explicação plausível é que os pirofosfatos presentes na marinada atuam como dissociadores de actina e miosina no músculo, facilitando a entrada da *Salmonella* sp. O acúmulo de solução aquosa entre as fibras pode facilitar a penetração devido a osmolaridade, tornando o processo de marinação fator facilitador para penetração bacteriana na carne. Além disso, um número significativo de *Salmonella* pode migrar no músculo intacto, com ou sem auxílio do vácuo. O congelamento também interferiu na penetração, devido à formação de cristais de gelo e rompimento das células (WARSON *et al*, 2008).

Apesar dos diferentes fatores que podem facilitar ou acelerar a migração bacteriana para o interior da carne, sabe-se que a carne de frango intacta possui uma estrutura pouco resistente à penetração bacteriana, diferentemente da pele. A pele contém uma superfície complexa com canais e fendas microscópicas recobertas com células epidérmicas em diferentes estágios de esfoliação, os quais limitam a difusão de células microbianas e assumem um papel de retenção de partículas. Já a superfície da carne é uma estrutura homogênea, coberta por colágeno e fibras reticulares, sendo que o tecido muscular é constituído por longos e paralelos feixes de fibras recobertos por tecido conjuntivo. Por isso, a taxa de crescimento bacteriano é maior na carne do que na pele. Além disso, a susceptibilidade da carne de frango é aumentada quando essa carne é picada, devido a degradação estrutural no momento do corte (NORIEGA *et al*, 2010).

Em 2015, Bosse *et al* estudou a taxa de migração e a distribuição espacial de partículas coloidais, que simularam bactérias imóveis, com e sem enzimas proteolíticas em carne suína. Os resultados mostraram que a adição de enzimas proteolíticas acelerou a migração das partículas na carne, no entanto não foi essencial para que a mesma ocorresse, demonstrando que nem a atividade proteolítica nem a motilidade são fatores essenciais para a penetração bacteriana na carne, apesar de terem grande importância na aceleração da mesma.

Considerando o exposto, não há dúvida da grande importância de *Salmonella* como um enteropatógeno na cadeia produtiva avícola devido à dificuldade de controle da mesma e por apresentar-se como um risco à saúde pública, por consequência da contaminação de carcaças e cortes durante o abate e processamento. Por meio da contaminação superficial das carcaças pode ocorrer a penetração para as camadas mais internas da carne de frango, sendo que fatores associados às bactérias, como motilidade e produção de proteases, e à estrutura da carne, como formação de lacunas, e aspectos extrínsecos como temperatura e tempo de armazenamento são variáveis de suma importância para delimitar o grau e a velocidade da penetração bacteriana e o risco a mesma apresenta para a saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2015**. São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.abpa-br.org>>

ANDERSON, M. E.; MARSHAL, R. T.; DICKSON, J. S. Estimating Depths of Bacterial Penetration Into Post-Rigor Carcass Tissue During Washing. **Journal of Food Safety**. v. 12. p. 191-198. Connecticut, USA: 1992.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001**. Brasil: 2001(a).

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº13, de 02 de janeiro de 2001**. Brasil: 2001(b).

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango – PREBAF. Brasil: 2012.

BACK, A. **Manual de Doenças das Aves**. 2 ed. Cafelândia, Brasil: Integração, 2010.

BMSAB - Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/-bmsab.html>>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Programa Nacional de Sanidade Avícola. In: **Manual de Legislação: Programas Nacionais de Saúde no Brasil**. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Integrado de Vigilância e Controle da Febre Tifóide**. Brasília: 2008.

BÄUMLER, A. J.; HARGIS, B. M.; TSOLIS, R. M. Tracing the Origins of Salmonella Outbreaks. **Science**. v. 287. USA: 2000. Disponível em: <science.sciencemag.org>

BOSSE, R.; GIBIS, M.; SCHMIDT, H.; WEISS, J. Kinetics of migration of colloidal particles in meat muscles in the absence and presence of a proteolytic enzyme to simulate non-motile bacteria penetration. **Food Research International**. n. 75. P.79-88. Germany: 2015.

CAFFER, M. I.; TERRAGNO, R. **Manual de Procedimientos para la Caracterización de Salmonella**. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Bacteriología. Argentina: 2001.

CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M.; STOPPA, G. F. Z.; CASTRO, A. G. M.; LUCIANO, R. L.; TESSARI, E. N. C. Ocorrência de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frango Provenientes de Abatedouros do Estado de São Paulo, Brasil, no Período de 2000 a 2010. **Revista Científica de Medicina Veterinária**. n. 24. São Paulo: 2015.

CDC - Center For Diseases Control. Update: Salmonella enteritidis infections and shell eggs. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. n. 39(50). p. 909-912. USA, 1990. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/mmwr/index.html> >

CDC – Center for Disease Control and Prevention’s. **National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Surveillance Overview**. USA: 2011.

CDC – Center for Disease Control and Prevention’s. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: Annual Report**. USA: 2013

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant Salmonella Heidelberg Infections Linked to Foster Farms Brand Chicken (Final Update)**. USA: 2014.

DELAQUIS, P. J.; GARIÉPY, C.; MONTPETIT, D. Confocal Scanning Laser Microscopy of Porcine Muscle Colonized by Meat Spoilage Bacteria. **Food Microbiology**. n. 9. p. 147-153. USA: 1992.

D’Aoust, J. Salmonella Species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: American Society for Microbiology, 1997.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources

of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **EFSA Journal**. n.12(2):3547, 312 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547. European Union: 2014.

ELMOSSALAMI, E.; WASSEF, N. Penetration of some Microorganisms in Meat. Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B-Journal Of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases Immunology Food Hygiene Veterinary Public Health – **ZBL. VET. MED. B.** v. 18. p. 329-336. Berlin and Hamburg: 1971.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Gram-Negative Bacteria: Salmonella species. In: **Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins**. Second Edition. USA: 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>

FILHO, R. L. A.; LIMA, E. D.; MENCONI, A.; ROCHA, T. S.; GONÇALVES, G. A. M. Pesquisa de *Salmonella* spp. em suabes de arrasto provenientes de granjas avícolas. **Revista Veterinária e Zootecnia**. v. 16. n. 1. p. 190-194. São Paulo: 2009.

FINSTAD, S.; O'BRYAN, C. A.; MARCY, J. A.; GRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. Salmonella and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**. USA: 2012.

FOLEY, S. L.; NAYAK, R.; HANNING, I. B.; JOHNSON, T. J.; HAN, J.; RICKE, S. C. Population Dynamics of Salmonella enterica Serotypes in Commercial Egg and Poultry Production. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 77. n. 13. p. 4273–4279. USA: 2011.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition**. New York: 2004.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 3. ed. Brasil: Elsevier, 2007.

GILL, C. O.; PENNEY. Penetration of bacteria into meat. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 33. n. 6. p. 1284-1286. New Zealand: 1977.

GILL, C. O.; PENNEY. A Research Note: Bacterial Penetration of Muscle Tissue. **Journal of Food Science**. v. 47. New Zealand: 1982.

GILL, C. O.; LEET, N. G.; PENNEY, N. Structural Changes Developing with Rigor that Facilitate Bacterial Invasion of Muscle Tissue. **Meat Science**. n. 10. p. 265-274. New Zealand: 1984.

GILL, C.O.; UTTARO, B.; BADONI, M.; ZAWADSKI, S. Distributions of brine and bacteria in beef primal cuts injected with brine without, or before or after mechanical tenderizing. **Meat Science**. n. 79. p. 181-187. USA: 2008.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. Supplement 2003 e 2007 (No. 47) to the White-

Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**. n. 161. p.26-29. France: 2010.

GUPTA, L. K.; NAGAMOHINI, Y. Penetration of poultry meat by *Pseudomonas* and *Lactobacillus* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. n. 8. p. 212-213. USA: 1992.

HERMANN, S. Principais Pontos Críticos de Controle de Ciclo da *Salmonella* na Cadeia de Produção Avícola. **Anais do XIII Simpósio Brasil Sul de Avicultura e IV Brasil Sul Poultry Fair**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F. Supplement 2008-2010 (No. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**. n. 165. p.526-530. France: 2014. JAMES, S.; JAMES, C. **Food Technologies: Chilling**. In: Encyclopedia of Food Safety. v. 3. p. 140-148. Reino Unido: 2014.

JAY, M. J. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. São Paulo: An Aspen Publication, 2000.

KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALOECER, I.; FARAH, S. M. S. S.; ABRAHÃO, W. S. M.; RODRIGUES, D. P. **Avaliação Epidemiológica de Surtos de Salmonelose Ocorridos no Período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil**. Acta Scientiarum. Health Sciences. vol. 32. n. 1. p.9-15. Maringá: 2010.

LAWRIE, R. A. **Ciência da Carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LORCA, T. A.; PIERSON, M. D.; CLAUS, J. R.; EIFERT, J. D.; MARCY, J. E.; SUMNER, S. S. Penetration of Surface-Inoculated Bacteria as a Result of Hydrodynamic Shock Wave Treatment of Beef Steaks. **Journal of Food Protection**. v. 65. n. 4. p. 616-620. USA: 2002.

LUBER, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology**. v. 134. p. 21-28. Germany: 2009.

LUCA, A. N. B.; KOERICH, G. M. D. Perfil **Epidemiológico de Surtos de DTA Causados por *Salmonella* sp. em Santa Catarina, Brasil, Notificados no Sinan Net de 2006 a 2008**. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Curitiba: 2009. Disponível em:

http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/livros_artigos/Perfil_dos_surtos_de_DTA_por_Salmonella_SC.pdf

NORIEGA, E.; LACA, A.; DÍAZ, M. Decisive Role of Structure in Food Microbial Colonization and Implications for Predictive Microbiology. **Journal of Food Protection**. v. 73, n. 5. p. 938-951. USA: 2010.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistencia antimicrobiana de sorovares de *Salmonella* spp.

- isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. XX. n. X. p. 1-6. São Paulo: 2014.
- PHAC – Public Health Agency of Canada. Canadian integrated program for antimicrobial resistance surveillance: Retail food highlights, 2003-2012. **Canada Communicable Disease Report CDR**. v. 40 S-2. Canada: 2014.
- POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffman-White scheme. **Research in Microbiology**. n. 154. p. 173-174. France: 2003.
- POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffman-White scheme. **Research in Microbiology**. n. 155. p. 568-570. France: 2004.
- ROCCA, A.; UYTENDAELE, M.; CIBIN, V.; BARRUCCI, F.; CAPPÀ, V.; ZAYAGNIN, P.; LONGO, A.; RICCI, A. Survival of *Salmonella* Typhimurium in poultry-based meat preparations during grilling, frying and baking. **International Journal of Food Microbiology**. n.197. p.1–8. Italia: 2015.
- SCOTT, M. R. **Controlling Salmonella in Poultry Production and Processing**. Taylor e Francis Group. United States: 2012.
- SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. **Salmonella spp., Importante Agente Patogênico Veiculado em Alimentos**. Revista Ciência e Saúde Coletiva. vol. 13. p. 1675-83. Recife: 2008.
- SIKES, A.; MAXCY, R. B.; Postmortem Invasion of Muscle Food by a Proteolytic Bacterium. **Journal of Food Science**. v. 45. Nebraska: 1980.
- SILVA, E. N. DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 4. n. 2. p. 85-100. Campinas, Brasil: 2002.
- TINDAL, B. J. GRIMONT, P. A. D.; GARRIT, G. M. EUZÉBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**. n. 55. p. 521-524. Great Britain: 2005.
- THOMAS, C. J. ROURKE, R. D. O.; MCMEEKIN, T. A. Bacterial penetration of chicken breast muscle. **Food Microbiology**. n. 4. p. 87-95. Australia: 1987.
- WARSON, C. R.; ORTA-RAMIREZ, A.; MARKS, B. P.; RYSER, E. T.; BOOREN, A. M. Single Directional Migration of *Salmonella* into Marinated Whole Muscle Turkey Breast. **Journal of Food Protection**. vol. 71. n. 1. p. 153–156. USA: 2008.
- ZUNIGA, A. G.; ANDERSON, M. E.; MARSHAL, R. T.; IANNOTTI, E. L. A Model System for Studying the Penetration of Microorganisms into Meat. **Journal of Food Protection**. v. 54, n. 4, p.256-258. USA: 1991.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a capacidade de penetração de estirpes de *Salmonella* com a presença de microbiota deterioradora ou não, em cortes de peito de frango sob a influência de diferentes tempos e temperaturas de estocagem.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a contaminação natural de peitos de frango comercializados na região oeste do Paraná quanto a presença de *Salmonella* spp. na superfície e no interior da carne e sua relação com a microbiota deterioradora (psicrotróficos e *Pseudomonas* spp.).

Estudar a migração de dois sorovares de *Salmonella* (S. Enteritidis e S. Heidelberg) da superfície para a área interna em peitos de frango esterilizados por irradiação, tendo como variáveis a temperatura, o tempo e a presença de psicrotróficos proteolíticos.

Observar aspectos estruturais das fibras das amostras de carne de frango submetidas a diferentes condições de estocagem e observar a presença de *Salmonella* spp. no interior das amostras.

4. CAPITULO 1 - OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* EM CORTES DE PEITO DE FRANGO E QUANTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DETERIORADORA

Ocorrência de *Salmonella* em Cortes de Peitos de Frango e Quantificação da Microbiota Deterioradora

RESUMO - *Salmonella* sp. possui capacidade de penetrar para o interior da carne, sendo que outras bactérias como *Pseudomonas* spp., psicotróficos e psicotróficos proteolíticos podem auxiliar nessa penetração. Diante disso, realizou-se a pesquisa do patógeno em 21 peitos de frango, os quais foram segmentados em quatro partes, sendo elas pele, superfície, meio e interior. Subentendendo-se que a contaminação do frango ocorre na superfície, o estudo objetivou verificar a ocorrência de *Salmonella* sp. nos segmentos mais interiores do peito de frango e a possível influência de bactérias deterioradoras na presença de *Salmonella* sp. nesses segmentos. Como esperado, a porção com maior presença do patógeno foi a pele, seguida da superfície; os segmentos mais internos apresentaram uma porcentagem menor, porém foi detectada a bactéria. Isso sugere que a *Salmonella* sp. é capaz de penetrar para o interior da carne de frango. Não foi possível correlacionar a presença de bactérias deterioradoras com o aumento da prevalência de *Salmonella* sp. no interior da carne.

Palavras-chave: penetração bacteriana, psicotróficos, *Pseudomonas* spp.

Salmonella Occurrence in Chicken Breasts and Quantification of Spoilage Microbiota

ABSTRACT - *Salmonella* sp. has the possibility to penetrate into the meat, and other bacteria such *Pseudomonas* spp., psychrotrophic bacteria and proteolytic psychrotrophics may help this penetration. Thus, one realized the pathogen research in 21 chicken breasts, which were segmented into four parts: skin, surface, middle and inner. Then, being understood that the chicken contamination occurs on the surface, the study aimed to verify the occurrence of *Salmonella* sp. in the innermost segments of the chicken breast and the possible influence of bacterial spoilage in the presence of *Salmonella* sp. in these segments. As expected, the portion with increased pathogen was skin, then the surface; the innermost segments showed a smaller percentage, but the bacterium was detected. This shows that the *Salmonella* sp. is able to penetrate into the chicken meat. It was not possible to correlate the presence of spoilage bacteria with increasing prevalence of *Salmonella* sp. inside the meat.

Keywords: bacterial penetration, psychrotrophic, *Pseudomonas* spp.

4.1 Introdução

Surtos alimentares ocasionados por *Salmonella* spp. configuram uma grande preocupação da indústria alimentícia e dos órgãos governamentais de controle sanitário de vários países. *Salmonella* sp. é um bacilo Gram-negativo presente naturalmente no trato gastrointestinal de aves e mamíferos (JAY, 2000) e, por conta disso, produtos avícolas, como carne e ovo, estão frequentemente envolvidos em surtos. O “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), a “Food and Drug Administration” (FDA) ambas dos EUA, a “European Food Safety Authority” (EFSA), a “Public Health Agency of Canada” (PHAC) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (ANVISA) do Brasil relatam frequentemente surtos ocasionados por produtos avícolas contaminados com *Salmonella* sp.

Segundo o CDC, em 2013, a carne de frango foi responsável por 10% dos surtos alimentares nos Estados Unidos, além de ocupar o primeiro lugar na associação alimento-patógeno, estando associada ao patógeno *Salmonella* sp. Além disso, 47% dos surtos alimentares foram provocados por bactérias, sendo que *Salmonella* sp. foi responsável por 26% desses surtos, tendo como principais sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Newport*, e *S. Javiana*. Esse patógeno ainda foi responsável por 62% das hospitalizações em 2013 (CDC, 2013).

Sabe-se que *Salmonella* é frequentemente encontrada em carne de frango e produtos a base de frango (EFSA e ECDC, 2014; FINSTAD *et al*, 2012; CDC, 2013). Dessa forma, a produção de carne de frango com qualidade deve ser preconizada em toda a cadeia produtiva, desde o controle sanitário da produção até o emprego de medidas de controle higiênico-sanitário na indústria. Segundo Hermann (2012), a contaminação das aves por *Salmonella* spp. ocorre via oral, as bactérias instalam-se na parede intestinal, multiplicam-se e são eliminadas pelas fezes. As aves podem carrear *Salmonella* sp. para a indústria de processamento, principalmente através da penas, pés e sistema digestório. Sabe-se que, apesar das ferramentas de controle adotadas pelas indústrias, como Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

(APPCC), não é possível eliminar essa bactéria durante o processamento da carne de frango, devido a resistência do patógeno (SCOTT *et al*, 2012).

A salmonelose em humanos, decorrente de carne de aves, possui duas rotas de contaminação importantes, o sub-processamento, que ocorre devido ao consumo de carne crua ou mal cozida, e a contaminação cruzada de alimentos que não passam por processo térmico, a qual tem os utensílios de cozinha e as mãos do manipulador como veículos de contaminação. Apesar de não haver o hábito de se consumir de carne frango de crua ou mal cozida, os métodos de preparo não são eficazes para verificação da temperatura interna da carne em cozinhas domiciliares, sendo que *Salmonella* spp. pode permanecer intacta em pontos mais internos da carne (“cold points”) (ROCCATO *et al*, 2015).

Em estudo realizado em 2009 foi encontrada uma incidência de 3,8% de *Salmonella* sp. no interior da carne de frango, esses dados mostram que, mesmo em pequenas quantidades, essas bactérias são capazes de penetrar para o interior da carne, por isso, acredita-se que o sub-processamento seja uma questão importante do ponto de vista da saúde pública (LUBER, 2009). Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivos determinar a prevalência de *Salmonella* sp. em peitos de frango com pele e com osso expostos no comércio varejista e o principal local de contaminação neste corte, na superfície ou interior das massas musculares.

4.2 Material e métodos

Foram adquiridos vinte e um peitos de frango congelados com pele e com osso (por serem menos manipulados e preservarem a integridade do tecido nas camadas mais internas) no mercado varejista da região oeste do Paraná. As amostras foram coletadas entre os meses de setembro e novembro de 2014, utilizando-se como critérios a aquisição apenas de cortes embalados na indústria e a seleção de diferentes marcas e diferentes lotes. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas até

Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Água e Alimentos do Depto. de Ciências Veterinárias da UFPR, Setor Palotina, onde foram descongeladas “overnight”. Metade da amostras de peito foi dividida em quatro subamostras de aproximadamente 1cm de espessura cada: segmento 1 - pele, segmento 2 – carne superficial, oriundo da carne em contato direto com a pele, segmento 3 - meio e segmento 4 - interno, o mais distante da superfície e em contato com os ossos do peito (Figura 1). De cada segmento foi pesada uma unidade analítica de 25g para pesquisa de *Salmonella* sp., totalizando quatro unidades analíticas por amostra. Já para contagem de psicotróficos, psicotróficos proteolíticos e *Pseudomonas* spp. foi pesada uma única unidade analítica de 25g da outra metade da amostra de peito de frango.

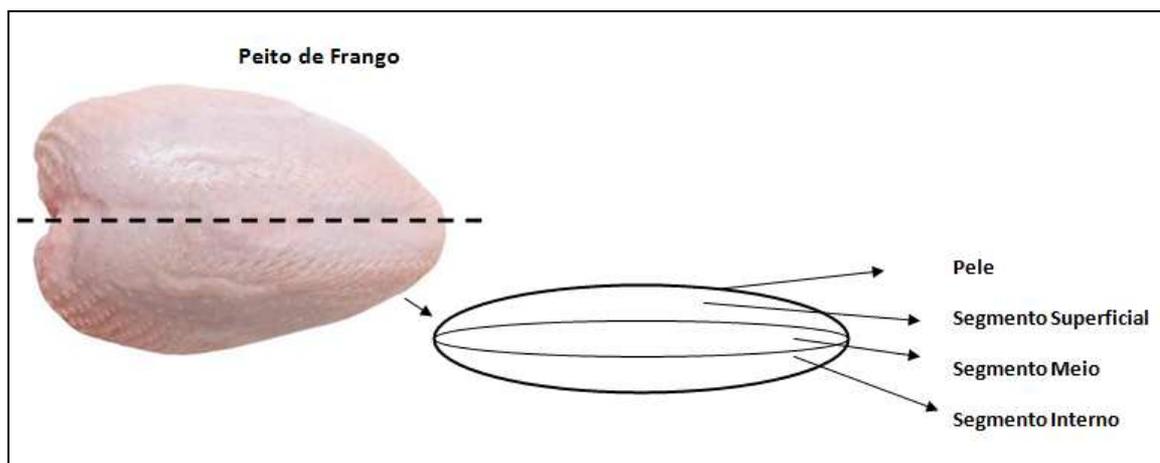


Figura 1. Esquema explicativo da divisão do peito de frango em subamostras

A pesquisa *Salmonella* sp. seguiu-se conforme metodologia preconizada por Andrews & Hammack (2007), com adaptações, utilizando-se pré-enriquecimento em Água Peptonada Tamponada – APT (DIFCO) acondicionada em estufa 35°C/18h e enriquecimento seletivo em Rappaport-Vassialidis (HIMEDIA) acomodado em banho-maria 42,5°C/24h e Tetracionato (HIMEDIA) em estufa 35°C/24h. O plaqueamento seletivo e diferencial foi realizado em ágar Xilose Lisina Desoxicolato –

XLD (DIFCO) e ágar Bismuto Sulfito - BS (DIFCO) incubados em estufa 35°C/24h. Para confirmação, utilizou-se de bioquímico preliminar em ágar Tríplice Açúcar Ferro – TSI (HIMEDIA) e ágar Lisina Ferro - LIA (DIFCO) e sorologia com soro polivalente somático (BIO-RAD). Para as cepas com resultado sorológico positivo e reação bioquímica característica em TSI e Lia, foi realizados os demais testes bioquímicos confirmatórios: Citrato de Simmons (DIFCO), Sulfito Indol Motilidade - SIM (MERCK), Malonato (DIFCO), Ureia (DIFCO), Vermelho de Metila e Vosges-Proskauer - VM-VP (DIFCO).

Para contagem dos deterioradores, 25g da amostra era diluída em solução salina 8,5% e homogeneizada em aparelho Stomaker . Seguindo-se a metodologia de Frank e Youssef de 2004 (FRANK e WEHR, 2004), para análise de psicotróficos, uma alíquota de 0,1mL dessa diluição era transferida para placa de Ágar Padrão Contagem – PCA (HIMEDIA), pela técnica de semeadura superficial, a qual era incubada 7°C/10d. Posteriormente a contagem das colônias, as mesmas eram transferidas para placas de PCA com adição de 1% de leite, incubadas 7°C/10d, para observação da capacidade proteolítica através da formação de halo de proteólise no ágar.

Por último, para contagem de *Pseudomonas* spp utilizou-se como referência a metodologia da ISO 13720 de 1995 (SILVA, 2010). Dessa forma, uma alíquota de 0,1mL da diluição era transferida para placa de Ágar Cetrimida Fucidina Cealoridina - CFC (DIFCO) adicionado de 1% de glicerina, pela técnica de semeadura superficial, a qual era incubada 25°C/48h. Após a contagem, as colônias foram confirmadas pelos testes oxidase e coloração de Gram.

4.3 Resultados e Discussão

Conforme observado na Tabela 1, das 21 amostras de peito de frango, nove (42,8%) apresentaram contaminação por *Salmonella* sp. em pelo menos um dos segmentos analisados, sendo importante destacar que as amostras com resultado positivo nos segmentos mais internos, necessariamente, tiveram resultado positivo na

pele. Isto indica que a rota de contaminação ocorre do exterior para o interior da carne de peito de frango e mostra a importância que *Salmonella* sp. tem na contaminação superficial de carcaças de frango durante o abate e processamento dos cortes.

Tabela 1. Resultados referentes à presença de *Salmonella* sp. nos segmentos pele, superficial, meio e interno nas 21 amostras de peito de frango analisadas

Amostra	Segmento			
	P	S	M	I
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	+	-	-	+
5	-	-	-	-
6	+	+	-	-
7	+	-	-	-
8	+	+	+	-
9	+	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	+	-	-	-
15	-	-	-	-
16	+	-	-	-
17	+	+	-	-
18	+	+	-	+
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
Total	9 (42,9%)	4 (19%)	1 (4,7%)	2 (9,5%)

Legenda: P = segmento pele; S = segmento superficial; M = segmento meio; I = segmento interno; - (ausência); + (presença).

Apesar da contaminação da pele ter sido maior, nos segmentos internos, também foi verificada a presença de *Salmonella* sp., resultado que indica a capacidade

de penetração do patógeno para o interior da carne. Wessling *et al* (2014a; 2014b), em estudo de contaminação artificial, constatou que *Salmonella* sp. é capaz de penetrar na carne de frango, tendo como fatores influenciadores a temperatura e o tempo de estocagem. Em outros estudos foi descrito que a ação de enzimas proteolíticas, a pressão osmótica, as diferenças estruturais da carne (como pré e pós-rigor), a motilidade bacteriana, o vácuo e a presença de culturas proteolíticas tem ação sobre a penetração de *Salmonella* sp. e outras bactérias para o interior da carne (Gill e Penney, 1977; Gil *et al*, 1984; Thomas *et al*, 1987 e Warson, 2008). Esse conjunto de resultados indica a possibilidade da presença de *Salmonella* sp. no interior da carne e reforça a importância de submeter a carne de frango a processamento térmico adequado (>74°C), para garantir a eliminação do patógeno nas áreas mais centrais da carne, conhecidos como “cold points” (BUCHER *et al*, 2008; USDA, 2008).

No que diz respeito aos deterioradores (Tabela 2), em apenas 19% das amostras foi possível detectar *Pseudomonas* spp.; em 66,7% das amostras foi detectada a presença de psicrotóxicos e em 38% de psicrotóxicos proteolíticos. As bactérias deterioradoras, em especial as proteolíticas podem ser facilitadoras da penetração de *Salmonella* sp. na carne (Thomas, 1987), porém, em concordância com os resultados de Wessling *et al* (2014a; 2014b), as amostras com contagens maiores para bactérias indicadoras tiveram, aparentemente, menor frequência de *Salmonella* sp. Entende-se, dessa forma, que a competição por nutrientes se sobressai à vantagem do aumento de enzimas proteolíticas oriundas de outras culturas, resultando na inibição da *Salmonella* sp. ao invés da promoção da penetração desta na carne. A liberação de enzimas proteolíticas pelas bactérias ocorre apenas no final da fase logarítmica de crescimento, quando a carne está num estágio avançado de deteriorização, dessa forma a penetração bacteriana baseada nesta premissa ocorreria apenas em carnes deterioradas, característica não observada na carne de frango utilizada no presente trabalho (GILL e PENNEY, 1977).

Tabela 2 - Média das contagens de *Pseudomonas* spp., psicrotróficos e psicrotróficos proteolíticos (UFC/g) nas amostras de peito de frango com pele e com osso que apresentaram resultados positivos e negativos para *Salmonella* sp.

<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomonas</i>		Psicrotróficos		Psicrotróficos proteolíticos	
	C	ND	C	ND	C	ND
(-) negativo (12)*	3 (1,6x10 ²)	9	7 (3,1x10 ²)	5	5 (2,4x10 ²)	7
(+) positivo (9)*	1 (1x10 ²)	8	7 (2,3x10 ²)	2	3 (1,3x10 ²)	6

Legenda: C – n° de amostras com contagem; ND (não detectado) – número de amostras sem contagem (<10²UFC/g). *Os números entre parênteses representam o número total de amostras positivas e negativas para *Salmonella*.

4.4 Conclusões

A ocorrência de *Salmonella* sp. em peitos com pele e com osso foi considerada elevada; além disso, foram identificados resultados positivos para *Salmonella* sp. tanto nos segmentos superficiais, como no interior da carne de frango, fato que sugere sua capacidade de penetração e chama a atenção para a importância do processamento térmico adequado antes do consumo da carne. Neste estudo, os agentes deterioradores não demonstraram ter influência sobre a penetração de *Salmonella* sp, em contrapartida, a competição microbiana pode ter inibido o desenvolvimento do patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W.; HAMMACK, T. *Salmonella*. In: Bacteriological Analytical Manual. Food And Drug Administration. US: 2007.

BUCHER, O. D'AOUST, J. Y.; HOLLEY, R. A. Thermal resistance of *Salmonella* serovars isolated from raw, frozen chicken nuggets/strips, nugget meat and pelleted broiler feed. **International Journal of Food Microbiology**. n. 124. p. 195–198. Canada: 2008.

CDC – Center for Disease Control and Prevention's. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: Annual Report**. USA: 2013.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **EFSA Journal**. n.12(2):3547, 312 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547. European Union: 2014.

FINSTAD, S.; O'BRYAN, C. A.; MARCY, J. A.; GRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. Salmonella and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**. USA: 2012.

FRANK, J. F.; YOUSEF, A. E. Test for groups of microorganisms. In: WEHR, H. M.; FRANK, J. K. **Standard methods for the examination of dairy products**. ed. 17. Washington: American Public Health Association, 2004.

GILL, C. O.; PENNEY. Penetration of bacteria into meat. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 33. n. 6. p. 1284-1286. USA: 1977.

GILL, C. O.; LEET, N. G.; PENNEY, N. Structural Changes Developing with Rigor that Facilitate Bacterial Invasion of Muscle Tissue. **Meat Science**. England:1984

HERMANN, S. Principais Pontos Críticos de Controle de Ciclo da *Salmonella* na Cadeia de Produção Avícola. **Anais do XIII Simpósio Brasil Sul de Avicultura e IV Brasil Sul Poultry Fair**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012.

JAY, M. J. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. São Paulo: An Aspen Publication, 2000.

LUBER, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology**. vol. 134. p. 21-28. Germany: 2009.

SCOTT, M. R. **Controlling Salmonella in Poultry Production and Processing**. Taylor e Francis Group. United States: 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. Varela: 2010.

THOMAS, C. J. ROURKE, R. D. O.; MCMEEKIN, T. A. Bacterial penetration of chicken breast muscle. **Food Microbiology**. n. 4. p. 87-95. Australia: 1987.

USDA – United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. **Kitchen Companion: Your Safe Food Handbook**. Washington: 2008. Disponível em: < <http://www.fsis.usda.gov> >

WARSON, C. R.; ORTA-RAMIREZ, A.; MARKS, B. P.; RYSER, E. T.; BOOREN, A. M. Single Directional Migration of *Salmonella* into Marinated Whole Muscle Turkey Breast. **Journal of Food Protection**. vol. 71. n. 1. p. 153–156. USA: 2008.

WESSLING, C. R.; SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; LAMPUGNANI, C.; PERIN, A. P.; BERSOT, L. S.. Penetration of *Salmonella* Enteritidis in Chicken Breasts Stored under Refrigeration. European Symposium on Food Safety. Poster Abstracts. Budapest, 2014.

WESSLING, C. R.; VIANA, C.; SOARES, V. M.; LAMPUGNANI, C.; PERIN, A. P.; MARQUES, R. K.; BERSOT, L. S.. Penetration of *Salmonella* Enteritidis in Chicken Breasts Stored under Refrigeration Temperatures. Anais do 12º Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos – MICROAL 2014. Blucher Food Science Proceedings, n. 1, v. 1. São Paulo: Editora Blucher, 2014. DOI 10.5151/foodsci-microal-117

5. CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO DE *SALMONELLA* HEIDELBERG E *S. ENTERITIDIS* EM PEITOS DE FRANGO

Avaliação da Migração de *Salmonella* Heidelberg e *S. Enteritidis* em Peitos de Frango

RESUMO - *Salmonella* spp. é responsável pela maioria dos surtos alimentares em diversos países, sendo que a ingestão de carne de frango subprocessada termicamente é uma das formas de contaminação. Essa bactéria é capaz de migrar para o interior da carne, sendo que as condições de estocagem e a presença de microbiota proteolítica podem influenciar nessa migração. O trabalho teve o objetivo de verificar a interferência das variáveis tempo e temperatura de estocagem e presença de psicotróficos proteolíticos no processo de migração. Para realização do experimento em seis repetições foi conduzido um delineamento inteiramente casualizado sendo que para a casualização, os peitos de frango sem pele e sem osso congelados foram divididos blocos com auxílio de um furador do tipo "cork borer". Os blocos de peito de frango foram submetidos a quatro tratamentos, *S. Enteritidis*, *S. Enteritidis* com psicotróficos, *S. Heidelberg* e *S. Heidelberg* com psicotróficos, a cinco tempos de armazenamento, 6, 12, 24, 48 e 168 horas, e a três temperaturas 2, 7 e -30°C. Após a inoculação e armazenamento, as amostras foram divididas segmentos iguais, sendo o segmento A o mais superficial, B o intermediário e C o mais interno deles. Cada segmento foi diluído em solução salina e plaqueado em ágar específico para contagem de colônias. Os resultados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de SNK ($p \leq 0,05$). *S. Heidelberg* e *S. Enteritidis* obtiveram êxito na migração pela carne frango em todas variações de tempo-temperatura e tratamentos, além disso, verificou-se diferença estatística para "tempo" e "tratamento". Com relação ao tempo, os dados sugerem que a migração de *Salmonella* sp. foi progressiva até o tempo de 24h, porém decaiu com 48h. Em relação aos tratamentos, *S. Enteritidis* com psicotróficos teve contagens menores que os outros três tratamentos, os quais foram iguais entre si. Conclui-se que *Salmonella* sp. é capaz de migrar para o interior da carne em um curto período de tempo, mesmo em temperaturas baixas, e que a presença de psicotróficos proteolíticos provocou efeito inibitório na migração do sorovar *S. Enteritidis*.

Palavras-chave: frango, penetração bacteriana, salmonelose.

Migration assessment of *Salmonella* Heidelberg and *S. Enteritidis* in chicken breasts

ABSTRACT - *Salmonella* spp. is responsible for most food outbreaks in many countries. One of the forms of contamination is the ingestion of undercooked chicken meat. This bacteria are able to migrate into the meat, and that the storage conditions and the presence of proteolytic microflora may influence this migration. The study aimed to verify the interference of variable storage periods and temperature and the presence of proteolytic psychrotrophic in the migration process. For the experiment in six replications was conducted a randomized design. For this action ('casualization'), the frozen chicken breasts without skin and bone were divided into blocks with the aid of an awl type cork borer. The chicken breast blocks were submitted to four treatments: *S. enteritidis*, *S. Enteritidis* with psychrotrophic, *S. Heidelberg* and *S. Heidelberg* with psychrotrophic, and to five storage periods, that's to say: 6, 12, 24, 48 and 168 hours,

and to three refrigeration temperatures: 2°, 7° and -30°C. After inoculation and storage, the samples were divided into equal segments; segment A was the most superficial, B the intermediate and C the innermost of them. Each segment was diluted in saline and plated on specific agar for colony count (microbian infestation' contage). The results were submitted to analysis of variance and comparisons of means by SNK test ($P \leq 0.05$). *Salmonella* sp. succeeded by migration chicken in all variations of time-temperature and treatments and, in addition, statistical difference was found for the item "time" and "treatment". Related to time, the data suggest that the migration of *Salmonella* sp. has been gradual during the first 24 hours, but declined around or after 48 hours. With regard to treatments, *S. Enteritidis* with psychrotrophic had lower results than the other three treatments which have been equal. One can conclude that *Salmonella* sp. is, in fact, able to migrate into the meat in a short time even at low temperatures, and the presence of proteolytic psychrotrophic had inhibitory effect on the migration of serotype *S. Enteritidis*.

Keywords: bacterial penetration, chicken, salmonellosis.

5.1 Introdução

Surtos alimentares ocasionados por *Salmonella* sp. configuram uma grande preocupação da indústria alimentícia e dos órgãos governamentais de controle sanitário de vários países. *Salmonella* sp. é um bacilo Gram-negativo presente naturalmente no trato gastrointestinal de aves e mamíferos (JAY, 2000) e, por conta disso, produtos avícolas, como carne e ovo, estão frequentemente envolvidos em surtos (EFSA, 2011; FINSTAD *et al*, 2012; CDC, 2013). O “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC), a “Food and Drug Administration” (FDA) ambas dos EUA, a “European Food Safety Authority” (EFSA), a “Public Health Agency of Canada” (PHAC) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (ANVISA) relatam frequentemente surtos ocasionados por produtos avícolas contaminados com *Salmonella* sp. Segundo o CDC, em 2013, 47% dos surtos alimentares foram provocados por bactérias, sendo que *Salmonella* sp. foi responsável por 26% desses surtos, tendo como principais sorovares *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Newport*, e *S. Javiana* (CDC, 2013).

Dessa forma, a produção de carne de frango de qualidade deve ser preconizada em toda a cadeia produtiva, desde o controle sanitário da produção até o emprego de medidas de controle higiênico-sanitário na indústria. Segundo Hermann (2012), a contaminação das aves por *Salmonella* sp. ocorre via oral, as bactérias instalam-se na parede intestinal, multiplicam-se e são eliminadas pelas fezes. As aves podem carrear

Salmonella sp. para a indústria de processamento, principalmente através da penas, pés e sistema digestório. Sabe-se que, apesar das ferramentas de controle adotadas pelas indústrias, como Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), não é possível eliminar essa bactéria durante o processamento da carne de frango (SCOTT *et al*, 2012).

A salmonelose em humanos, decorrente de carne de aves, possui duas rotas de contaminação importantes, o sub-processamento, caracterizado por consumo de carne crua ou mal cozida, e a contaminação cruzada de alimentos que não passam por processo térmico, a qual tem os utensílios de cozinha e as mãos do manipulador como veículos de contaminação. Em estudo realizado em 2009 foi encontrada uma incidência de 3,8% de *Salmonella* sp. no interior da carne de frango, demonstrando que, mesmo em pequenas quantidades, essas bactérias são capazes de penetrar para o interior da carne, por isso, comprovando-se que o sub-processamento é uma questão importante do ponto de vista da saúde pública (LUBER, 2009).

Gill e Penney (1977), Thomas *et al* (1987), Warson *et al* (2008) e Wessling (2014), demonstraram que a *Salmonella* sp. é capaz de penetrar para o interior da carne, sendo que a pressão osmótica, a presença de bactérias proteolíticas, o vácuo, e a temperatura podem ser fatores facilitadores dessa penetração. Roccato *et al* (2015) realizaram diferentes tratamentos térmicos em produtos a base de carne de aves contaminados artificialmente com *Salmonella* sp. e concluíram que o preparo inadequado do produto mantém células viáveis da bactéria em seu interior.

A compreensão da penetração de *Salmonella* na carne de frango é importante para auxiliar no estabelecimento de padrões de estocagem, armazenamento e preparo da carne de frango, visando a melhor qualidade do produto final e a segurança alimentar para o consumidor. Diante disso, o presente trabalho objetivou avaliar a migração de *Salmonella* para o interior da carne por meio da inoculação artificial de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* em peitos de frango previamente irradiados, submetidos a diferentes condições de estocagem e na presença ou ausência de psicotróficos proteolíticos.

5.2 Material e métodos

Foram adquiridos 34 kg de peito de frango com pele e com osso congelados, em embalagens plásticas de 1kg, os quais foram esterilizados por irradiação, numa dosagem de 11 K Gy (quilogray) de raios gama (anexo 1 – certificado de dosimetria) a partir da fonte cobalto 60, no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), instalado na Universidade de São Paulo (USP). Posteriormente foram transportados, em caixas isotérmicas com gelo seco até o Laboratório de Inspeção e Controle de Qualidade de Água e Alimentos (LACOMA) da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina.

Para realização do experimento em seis repetições foi conduzido um delineamento inteiramente casualizado sendo que para a casualização, os peitos de frango sem pele e sem osso congelados foram parcialmente descongelados em temperatura de refrigeração por 8 horas e divididos assepticamente em cilindros com 3 cm de comprimento e 0,79 cm de diâmetro, com auxílio de um furador do tipo “cork borer”. Estas unidades foram misturadas e sub-amostras foram escolhidas aleatoriamente. Os blocos de peito de frango foram acomodados em placas de petri, com uma camada fina de ágar puro 2%, já solidificado. Posteriormente, as placas de petri foram preenchidas pelo mesmo ágar, de modo que toda a amostra ficasse coberta por ágar, com o objetivo de formar um isolante e evitar que as bactérias migrassem pela superfície e não pelo interior da carne.

Os blocos foram submetidos a quatro tratamentos de acordo com o tipo de inóculo e foram armazenados em temperaturas de refrigeração (2°C e 7°C) por períodos distintos (tabela 1) e em temperatura de congelamento (média de -30°C) por sete dias (168 horas). O controle de esterilidade (bloco sem inoculação) foi submetido às mesmas condições de temperaturas (2°C, 7°C e -30°C) e tempo em cada uma das repetições.

Tabela 1: Tratamentos empregados aos blocos de carne de frango e condições de incubação de acordo com os tempos empregados

Tratamento	Inóculo	Temperatura de Incubação (°C)	Tempos de incubação (h)
SE	S. Enteritidis	2; 7	6; 12; 24; 48
		-30	168
SH	S. Heidelberg	2; 7	6; 12; 24; 48
		-30	168
SEP	S. Enteritidis + PSI	2; 7	6; 12; 24; 48
		-30	168
SHP	S. Heidelberg + PSI	2; 7	6; 12; 24; 48
		-30	168

Ledenga: PSI - pool de psicrotróficos proteolíticos; SE – *Salmonella* Enteritidis; SEP – *Salmonella* Enteritidis com psicrotróficos; SH – *Salmonella* Heidelberg; SHP – *Salmonella* Heidelberg com psicrotróficos.

5.2.1 Preparo dos inóculos de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*

Foram utilizadas duas cepas de *Salmonella*, uma de *Salmonella* Enteritidis de origem aviária, sorotipada pelo Instituto Adolfo Lutz – SP, cedida pelo Prof. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho, do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu, SP. E uma cepa de *Salmonella* Heidelberg, oriunda de swab de arrasto de granjas avícolas, sorotipada e cedida pelo laboratório veterinário Mercolab, com sede em Cascavel, PR. Essas cepas ficaram armazenadas em ágar conservação, sob refrigeração, até o momento de sua utilização.

Para o preparo do inóculo, retirava-se uma alçada do ágar conservação e adicionava-a a 3 mL de caldo BHI - Infusão de Cérebro e Coração (HIMEDIA) com incubação a 35°C/18h. A partir deste subcultivo semeava-se por técnica de esgotamento em placa de ágar XLD - Xilose Lisina Desoxicolato (HIMEDIA) com incubação por 35°C/24h, para obtenção de colônias isoladas. Uma colônia isolada era transferida para 100 mL de caldo BHI que era incubado sob agitação a 120rpm em “shaker” a 37°C/24h. Após a incubação, a concentração microbiana no caldo BHI era de 10⁹ UFC/mL, transferia-se uma alíquota de 100 µL, a qual continha 10⁸ UFC/mL, desse

caldo para amostra. Para quantificação do inóculo, outra alíquota de 100 µl era semeada em ágar TSA - Agar Triptona Soja (HIMEDIA), incubado a 35°C/24h, (apêndice 1).

5.2.2 Preparo do Inóculo de Psicotróficos Proteolíticos

Para obtenção da microbiota psicotrófica proteolítica presente naturalmente na carne de frango, foram utilizadas carcaças comerciais de frango congelado, das quais foram retiradas uma unidade analítica de 25g de carne e pele da ponta das asas, da cloaca e do pescoço. À unidade analítica era adicionada a 225 mL de solução salina (0,85%) e homogenizada em stomacher (Seward™) por 2 minutos a 165rpm. Uma alíquota 0,1mL dessa solução era plaqueada na superfície do Ágar Padrão para Contagem – PCA (HIMEDIA). Essas placas foram incubadas a 7°C/10d e então as colônias foram transferidas, por picada, para placas de PCA com 1% de leite, as quais foram novamente incubadas a 7°C/10d.

Após a incubação, avaliou-se a capacidade proteolítica das bactérias psicotróficas através da formação de halo de proteólise ao redor da colônia. Foram selecionadas sete colônias de psicotróficos proteolíticos para utilização no trabalho, as quais foram armazenadas individualmente em caldo BHI com 20% de glicerina em temperatura de congelamento.

Para o preparo do inóculo foi feito um “pool” com as sete cepas de psicotróficos, para isso retirava-se uma alçada do ágar conservação de cada cepa e semeava-se em 3mL de caldo BHI – Infusão de Cérebro e Coração (HIMEDIA), incubado a 30°C/18h. A partir deste subcultivo semeava-se por técnica de esgotamento em placa de PCA – Ágar Padrão para Contagem (HIMEDIA) e incubava-se a 30°C/ 24h. Uma colônia isolada de cada placa, totalizando sete colônias, era transferida para 100 mL de caldo BHI, incubado a 30°C/24h. Após a incubação a concentração microbiana no caldo BHI era de 10^9 UFC/mL, transferia-se uma alíquota de 100 µl, com 10^8 UFC/mL de psicotróficos, desse caldo para amostra. Para quantificação do inóculo,

outra alíquota de 100 µl era semeada em ágar PCA - Agar Padrão para Contagem (HIMEDIA), incubado a 30°C/24h (apêndice 2).

5.2.3 Inoculação dos Micro-organismos

Em cada um dos blocos solidificados em ágar, conforme descrito, com o auxílio de uma ponteira cortada (estéril) de 1000 µl, confeccionava-se um poço em um dos extremos da amostra com o objetivo de realizar a inoculação de 100 µl de cada um dos tratamentos (apêndice 3). Após a inoculação, as amostras eram acondicionadas em incubadoras BOD, conforme a temperatura e o tempo definido para cada condição.

O procedimento de inoculação descrito acima foi realizado da mesma forma para todos os tratamentos, sendo que, para o tratamento 1 (T1), foi inoculado 10^8 de *Salmonella* Enteritidis e para o tratamento 2 (T2), 10^8 de *Salmonella* Heidelberg. O tratamento 3 refere-se ao T1 adicionado de 10^8 de psicrotróficos e o tratamento 4 refere-se ao T2, também acrescido de 10^8 de psicrotróficos. Os controles de esterilidade não receberam inóculo.

5.2.4 Quantificação das Bactérias Inoculadas

A avaliação da penetração de *Salmonella* sp. na carne de frango foi feita através de contagem bacteriana em três pontos distintos do bloco: segmento A (inicial - imediatamente em contato com o inóculo), segmento B (mediano) e segmento C (final - o mais distante do inóculo). As amostras foram seccionadas, sob condições assépticas em fluxo laminar e com o auxílio de uma faca estéril, em três segmentos de aproximadamente 1cm. Cada segmento era individualmente pesado em frascos do tipo falcom de 15 mL estéreis, onde se adicionava Água Peptonada Tamponada (HIMEDIA) na proporção de 1:10.

Após a homogeneização em vortex, o conteúdo era diluído em solução salina até obtenção das diluições 10^{-5} e 10^{-6} para o segmento A, 10^{-4} e 10^{-5} para o segmento B e 10^{-3} e 10^{-4} para o segmento C. A partir das diluições, alíquotas de 100 μ L eram semeadas em TSA (HIMEDIA) e incubadas a 35°C por 24h, para os tratamentos SE e SH. Para os tratamentos SEP e SHP, alíquotas de 100 μ L eram plaqueadas em XLD (35°C por 24h) e PCA (7°C por 10 dias), para realizar separadamente as contagens de *Salmonella* sp. e psicrotróficos (apêndice 4). Os resultados foram expressos em logUFC/g (apêndice 5).

5.2.5 Microscopia Eletrônica e Histologia

No intuito de verificar possíveis alterações morfológicas causadas pelos inóculos no tecido muscular estriado esquelético foram realizados cortes histológicos das amostras para verificação em microscopia eletrônica de varredura (MEV) e em microscopia ótica simples.

Com intuito ilustrativo, os segmentos de blocos dos tratamentos SH, SHP e SE foram submetidos à MEV no Centro de Microscopia Eletrônica, na Universidade Federal do Paraná - Curitiba. As amostras foram fixadas em fixador de Karnovsky - paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7.2 a 4°C - (Karnovsky, 1965). O material foi desidratado em série alcoólica crescente de álcool PA, sendo que o ponto crítico foi obtido em Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. Em seguida, o material foi metalizado em ouro no aparelho Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV.

Os cortes histológicos para microscopia ótica simples foram realizados no Laboratório de Patologia Veterinária do Departamento de Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná – Palotina. Foram reproduzidos em blocos de peito de frango, destinados às análises histológicas, os quatro tratamentos (SE, SH, SEP e SHP), nas temperaturas de 2°C e 7°C por 48h e no congelamento (-30°C) por 168h.

Além disso, para avaliar o impacto do processo de congelamento na estrutura celular das fibras musculares estriadas esqueléticas também foram processadas duas amostras de peito não irradiado e não inoculado, uma congelada e uma resfriada, logo após o abate.

As amostras foram depositadas em cacetes, fixadas em formol 10% por 48h e desidratadas em bateria de álcool puro: 70%, 80%, 90%, absoluto I e absoluto II, uma hora em cada. Posterior à desidratação, as amostras foram clareadas em xilol (em duas etapas), retiradas dos cacetes e incluídas com parafina, no formato de cubos. Esses cubos foram cortados em lâminas ultrafinas de parafina, com auxílio de um micrótomo, fixados em lâminas e lamínulas de vidro por 24h em estufa e corados com eosina e hematoxilina.

A captura de imagens e a avaliação das lâminas em relação ao grau de integridade tecidual foram realizadas em microscópio óptico, com aumento total de 400x. O grau de lesão tecidual foi caracterizado pelas lesões no sarcolema das fibras musculares estriadas esqueléticas. De forma sucinta, em cada campo observado avaliou-se o percentual de rupturas na membrana plasmática das células observadas. Foram avaliados 8 campos para cada grupo experimental.

5.3. Análises estatísticas

Os resultados obtidos das contagens microbianas de todos os tratamentos em todas as repetições foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK) a 5% de probabilidade. O software utilizado foi o Statistical Analysis Package (SAS).

Os resultados observados em relação ao grau de integridade tecidual, feito pela leitura das lâminas histológicas, foram submetidos à ANOVA, seguida de teste Tukey. A comparação entre os controle resfriado e congelado foi feita pelo teste t. O software utilizado para análise e foi o GraphPad Prims® 6 for Windows.

5.4. Resultados e Discussão

No presente trabalho, foi verificada a capacidade de migração de *Salmonella* Enteritidis (SE) e *Salmonella* Heidelberg (SH) isoladamente e também em conjunto com um “pool” de psicrotróficos proteolíticos (SEP e SHP) sob à influência dos tempos 6, 12, 24 e 48h, nas temperaturas de 2°C e 7°C, e do tempo 168h à -30°C. Optou-se trabalhar com temperaturas de refrigeração por períodos curtos de tempo e temperatura congelamento por um período de tempo mais longo com o intuito de simular condições de estocagem cotidianas de domicílios e supermercados. Não foram testadas temperaturas de abuso, pois esses dados já haviam sido obtidos em trabalho anterior (Wessling, 2014).

Para todo o conjunto de dados, foi avaliada a influência das variáveis testadas isoladamente (tempo, temperatura, tratamento) e também todas as interações possíveis entre elas (temperatura*tempo, temperatura*tratamento, tempo*tratamento, tempo*temperatura*tratamento) para os segmentos A, B e C., não tendo ocorrido diferença estatística nos segmentos A e B ($p > 0,05$). Em decorrência disso, as comparações estatísticas expressas foram realizadas apenas com as médias das contagens do segmento “C”, pois foi nesta porção mais distante do ponto de inoculação que se pode avaliar a “diferença da migração” entre as variáveis impostas. Além disso, o segmento B seria útil apenas para blocos em que não fosse possível contabilizar *Salmonella* no C, no entanto em todas as amostras houve migração até o segmento C. Na Figura 1, gráfico A e gráfico B, pode-se verificar a migração de *Salmonella* sp. em cada tratamento para as temperaturas de 2°C (A) e 7°C (B).

Os resultados revelam que *Salmonella* sp. teve êxito na migração pelo tecido da carne frango em todas variações de tempo-temperatura e tratamentos. Avaliando-se o comportamento de migração dos diferentes tratamentos a 2 e a 7°C, na figura 1, observa-se que SE a 2°C migrou de forma crescente até o tempo de 24h, tendo um declínio no tempo de 48h. O mesmo não ocorreu a 7°C, em que teve uma queda no tempo de 12h e um grande aumento nas contagens em 24 e 48h. SE adicionada de psicrotróficos proteolíticos (SEP), a 2°C teve comportamento de migração semelhante a

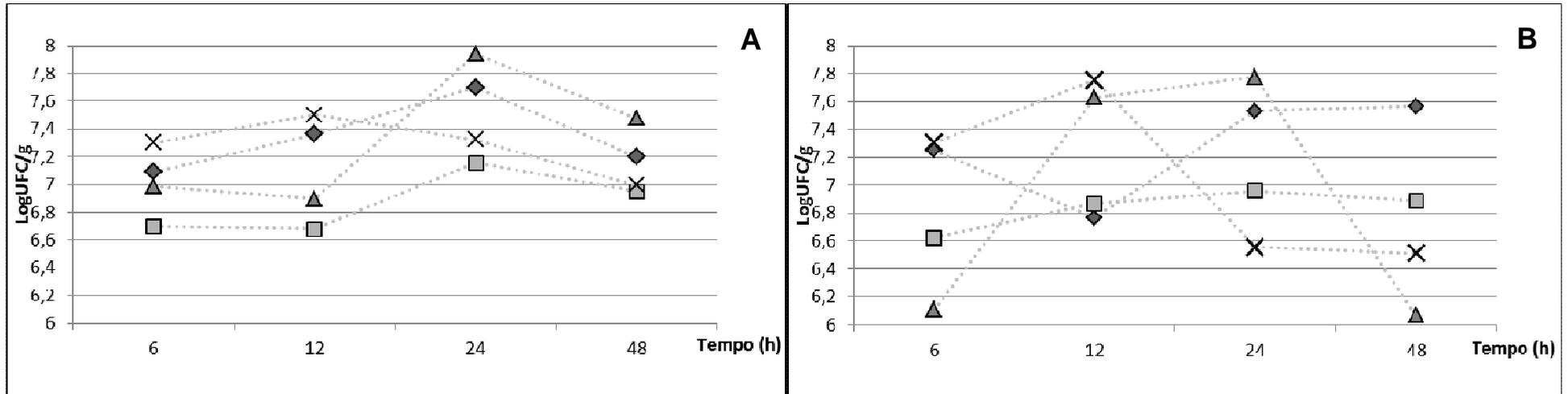


Figura 1. Contagem de *Salmonella* (em Log UFC/g) do segmento C para cada um dos tratamentos, na temperatura de 2°C (A) e 7°C (B) em função do tempo de armazenamento.

Legenda: ◆ - SE (*S. Enteritidis*); ■ - SEP (*S. Enteritidis* com psicrotróficos); ▲ - SH (*S. Heidelberg*); X - SHP (*S. Heidelberg* com psicrotróficos)

SE, porém a média das contagens foi menor em todos os pontos do gráfico. Já a 7°C, a curva formada por SEP foi diferente da curva de SE, especialmente no tempo de 12h, único ponto em que a contagem de SEP foi superior a de SE.

Na temperatura de 2°C, SH inicia a curva (6h) com uma média de aproximadamente 7LogUFC/g, sofre um leve declínio em 12h e um grande pico em 24h, com aproximadamente de 7,9LogUFC/g, seguido de uma queda para 7,5LogUFC/g. Uma curva diferente foi observada a 7°C, que teve a menor média de contagens em 6h, de aproximadamente 6,1LogUFC/g, subindo para 7,6LogUFC/g no tempo 12h e 7,8LogUFC/g no tempo 24h, decaindo novamente para 6,1LogUFC/g após 48h. A curva de SHP a 2°C foi crescente até 12h, decaindo em 24 e 48h, o mesmo comportamento pode ser visualizado a 7°C. é interessante salientar que os pontos de SHP nos gráficos não foram necessariamente menores do que os pontos de SH, relação que pode ser observada entre SEP e SE. Na tabela 3, posteriormente, pode-se visualizar que a maior taxa de migração foi alcançada com o tempo de 24h e que SEP migrou significativamente menos que os demais tratamentos.

Wessling (2014), em trabalho semelhante a esse, com inóculo de 10^3 UFC/g de *Salmonella*, demonstrou a capacidade de migração do patógeno em fragmentos de peito de frango armazenados a 2, 7 e 12°C. Gill e Penney (1977), Thomas *et al* (1987) e Warson *et al* (2008), também demonstraram que bactérias têm capacidade de penetrar para o interior da carne. Dentre os fatores que possibilitam a penetração de *Salmonella* sp. na carne, a produção de enzimas proteolíticas é primordial, segundo Gill e Penney (1977). A penetração bacteriana ocorre devido à degradação do endomísio, uma estrutura delicada e menos densa que as proteínas das fibras musculares, que é degradada rapidamente pelas proteases (GILL e PENNEY, 1977). Em contrapartida, Thomas, *et al* (1987), concluiu que o fator fundamental para que ocorra penetração bacteriana é a motilidade, ou seja, apenas bactérias móveis são capazes de penetrar na carne. Em 2015, Bosse *et al* estudou a taxa de migração e a distribuição espacial de partículas coloidais, que simularam bactérias imóveis, com e sem enzimas proteolíticas em carne de porco. Os resultados mostraram que a adição de enzimas proteolíticas acelerou a migração das partículas na carne, no entanto não foi essencial para que a

mesma ocorresse. Portanto, pode-se concluir que nem a atividade proteolítica nem a motilidade são fatores essenciais para penetração bacteriana na carne.

Contudo, além da motilidade e das propriedades proteolíticas, a penetração também depende de fatores intrínsecos e extrínsecos, como: atividade de água, temperatura, pH, pressão, a orientação das fibras e atmosfera. Estudo realizado por Gill, *et al* (1984) comparou as alterações estruturais da carne que podem interferir na penetração de bactérias, os fatores avaliados foram: diferenças estruturais da carne no pré-rigor e no pós-rigor, frente a soluções fixadoras hipo, iso e hipertônicas. A pressão osmótica da solução fixadora teve um efeito pronunciado na estrutura do músculo no pré-rigor, sendo que as fibras musculares em solução hipertônica tiveram seu diâmetro radial reduzido, em solução hipotônica ocorreu o oposto, as fibras tiveram seu diâmetro radial aumentado. Em contraste, no pós-rigor, as fibras não foram afetadas pelas pressões osmóticas das soluções fixadoras, devido à interrupção dos elementos da membrana plasmática. O aumento da osmolaridade do músculo no pós-rigor, em que há grande quantidade de ácido láctico, provoca o encolhimento das fibras musculares. Esse encolhimento provoca lacunas nos elementos contráteis das células, ocorrendo liberação de proteínas sarcoplasmáticas e queda do pH, fator que reduz a resistência do músculo frente à invasão bacteriana (GILL *et al*, 1984).

O trabalho realizado por Warson *et al* (2008), avaliou a interferência do vácuo na migração bacteriana em carne marinada (solução salina usada para melhorar as características sensoriais da carne) de peito de peru. A penetração direcional de *Salmonella* sp., em 3 cm, em condições atmosféricas leva 20h, enquanto que a vácuo leva 20 minutos. Além da interferência do vácuo, a marinada também pode ter interferido na penetração bacteriana. Uma explicação plausível é que os pirofosfatos presentes na marinada atuam como dissociadores de actina e miosina no músculo, facilitando a entrada da *Salmonella* sp. O acúmulo de solução aquosa entre as fibras pode facilitar a penetração devido a osmolaridade, isso torna o processo de marinação fator facilitador para penetração bacteriana na carne. Além disso, um número significativo de salmonela pode migrar no músculo intacto, com ou sem auxílio do vácuo. O congelamento também interfere na penetração, devido à formação de cristais

de gelo e rompimento das células por ruptura em diversas regiões do sarcolema da fibra (WARSON, 2008).

Na Tabela 2 pode-se observar o conjunto de dados correspondente às temperaturas de 2°C e 7°C para cada tempo de estocagem, com exceção das amostras congeladas, o qual foi submetido à comparação de médias para detecção de diferença estatística originada pelas variáveis isoladas tempo de incubação, temperatura de estocagem e tratamento e também por suas interações (temperatura*tempo, temperatura*tratamento, tempo*tratamento, tempo*temperatura*tratamento).

Não houve diferença estatística ao se comparar as médias obtidas entre as temperaturas em nenhuma das situações ($p>0,05$) e, desse modo, para as outras comparações estes resultados foram “agrupados”. Verificou-se que houve variação estatística para as variáveis isoladas “tempo” e “tratamento” ($p\leq 0,05$), porém não houve diferença significativa entre nenhuma das interações ($p>0,05$).

Tabela 2. Média das contagens, em LogUFC/g, do segmento C, nas temperaturas de 2°C e 7°C, em função do tempo e do tratamento.

Tratamento¹	Tempo				Média
	6h	12h	24h	48h	
SE	7,17	7,06	7,61	7,38	7,30^A
SEP	6,66	6,77	7,05	6,91	6,85^B
SH	6,54	7,26	7,85	6,77	7,10^A
SHP	7,30	7,62	6,93	6,75	7,15^A
Média	6,92^b	7,18^{ab}	7,36^a	6,95^b	

Letras minúsculas comparam a média geral dos resultados entre os tempos de incubação; letras maiúsculas comparam a média geral entre os tratamentos.

¹ Tratamento: SE – *Salmonella* Enteritidis; SEP – *Salmonella* Enteritidis com psicrotóxicos; SH – *Salmonella* Heidelberg; SHP – *Salmonella* Heidelberg com psicrotóxicos.

Com relação ao tempo de incubação, é possível avaliar pelos dados obtidos que *Salmonella* sp. migrou progressivamente até 24 horas, momento em que atingiu a maior contagem no segmento C. Com 48h a quantidade de *Salmonella* sp. no segmento C decaiu significativamente com relação a 24h, o que indicou morte celular entre 24 e 48h por possível esgotamento do substrato nutritivo dos blocos de peito de frango. Gill e

Penney em 1977 demonstraram que *S. Typhimurium*, com densidade celular de $10^7/\text{cm}^2$, não foi capaz de penetrar na carne em temperaturas de 5°C e 10°C por 14 dias. A 20°C a penetração ocorreu em 40 horas e a 37°C em 16 horas. No presente trabalho, após seis horas de armazenamento, as bactérias já haviam migrado até o segmento mais interno, mesmo sendo armazenadas em temperaturas de refrigeração (2°C e 7°C). Wessling (2014), ao inocular *S. Enteritidis* (10^3UFC/g) em carne de frango e armazená-la a 2, 7 e 12°C verificou que a temperatura foi um fator importante para eficiência da penetração bacteriana, sendo que o aumento da temperatura refletiu no aumento da migração. Isso não foi observado no trabalho atual ao compararmos as temperaturas 2°C e 7°C, já que não houve diferença estatística entre eles conforme já relatado.

Em relação aos tratamentos SE, SH e SHP foram iguais entre si, porém tiveram contagens significativamente maiores que o tratamento SEP. Esses resultados indicam que as bactérias psicrotróficas inibiram a penetração de *S. Enteritidis*, porém o mesmo não ocorreu com *S. Heidelberg*, que obteve o mesmo grau de migração na presença ou ausência de psicrotróficos. Esperava-se que os psicrotróficos proteolíticos tivessem um efeito para facilitar a migração de *Salmonella* sp., devido a possível degradação das estruturas do tecido muscular. No entanto essas bactérias exerceram um efeito negativo sobre *S. Enteritidis* e não interferiram sobre *S. Heidelberg*. A inibição do sorovar *Enteritidis* pode ter ocorrido devido à competição microbiana.

A avaliação de possíveis alterações morfológicas teciduais dos blocos de carne de frango provocados pelos psicrotróficos proteolíticos (SEP e SHP) demonstrou que nas temperaturas de 2°C e 7°C o tecido tinha uma porcentagem maior de lesões na presença de psicrotróficos proteolíticos. Em contrapartida, na temperatura de -30°C não foi demonstrada diferença na porcentagem de lesões teciduais entre os tratamentos (figura 2), possivelmente devido à redução do metabolismo bacteriano que cessa a produção de proteases (LEHNINGER *et al*, 2002).

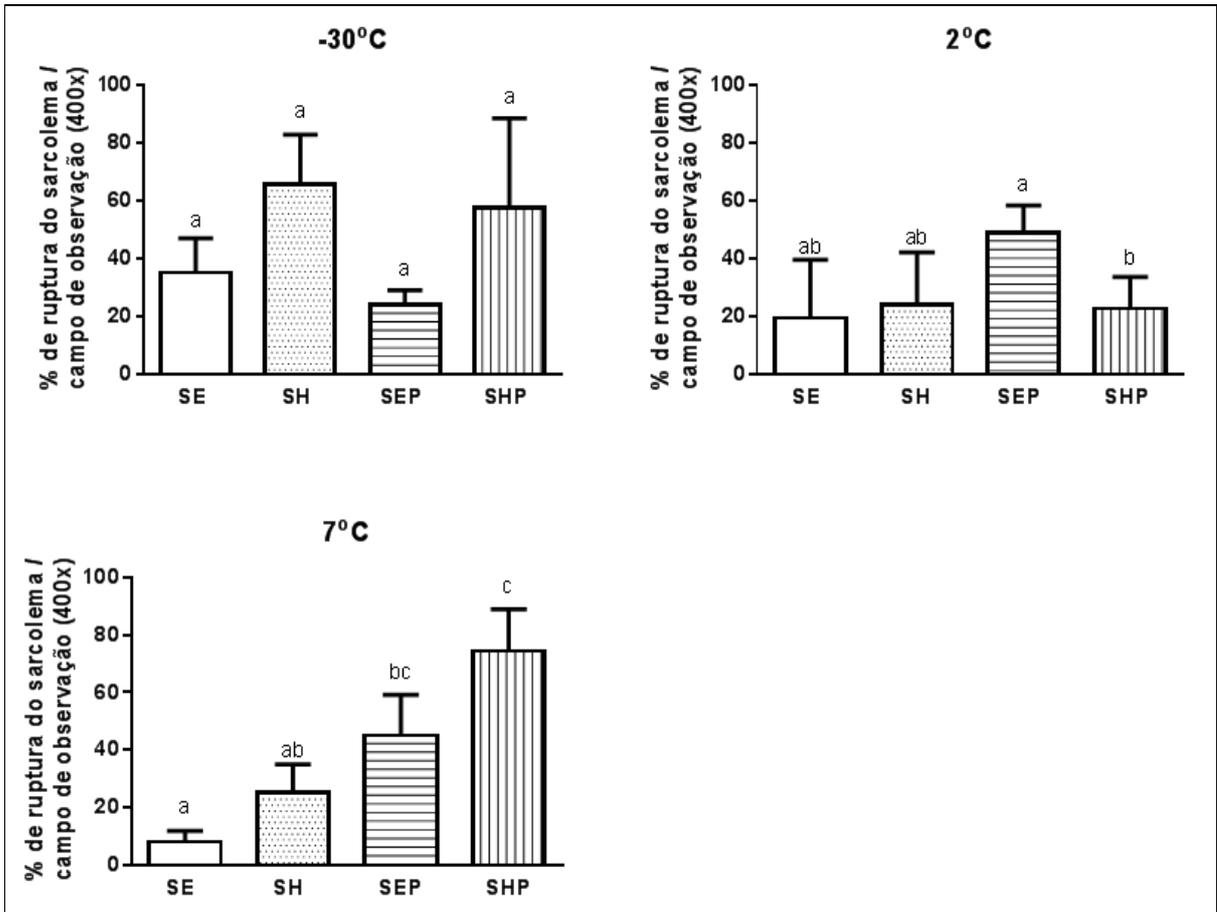


Figura 2. Comparação entre as porcentagens de ruptura do sarcolema entre os tratamentos SE, SH, SEP e SHP nas temperaturas de -30°C, 2°C e 7°C.

Legenda: SE – *Salmonella* Enteritidis; SEP – *Salmonella* Enteritidis com psicrotróficos; SH – *Salmonella* Heidelberg; SHP – *Salmonella* Heidelberg com psicrotróficos.

Na figura 3, a seguir, é possível visualizar a maior porcentagem de lesões nas fibras em blocos de peito de frango dos tratamentos SEP e SHP quando comparados aos tratamentos SE e SH, na temperatura de 2°C e 7°C.

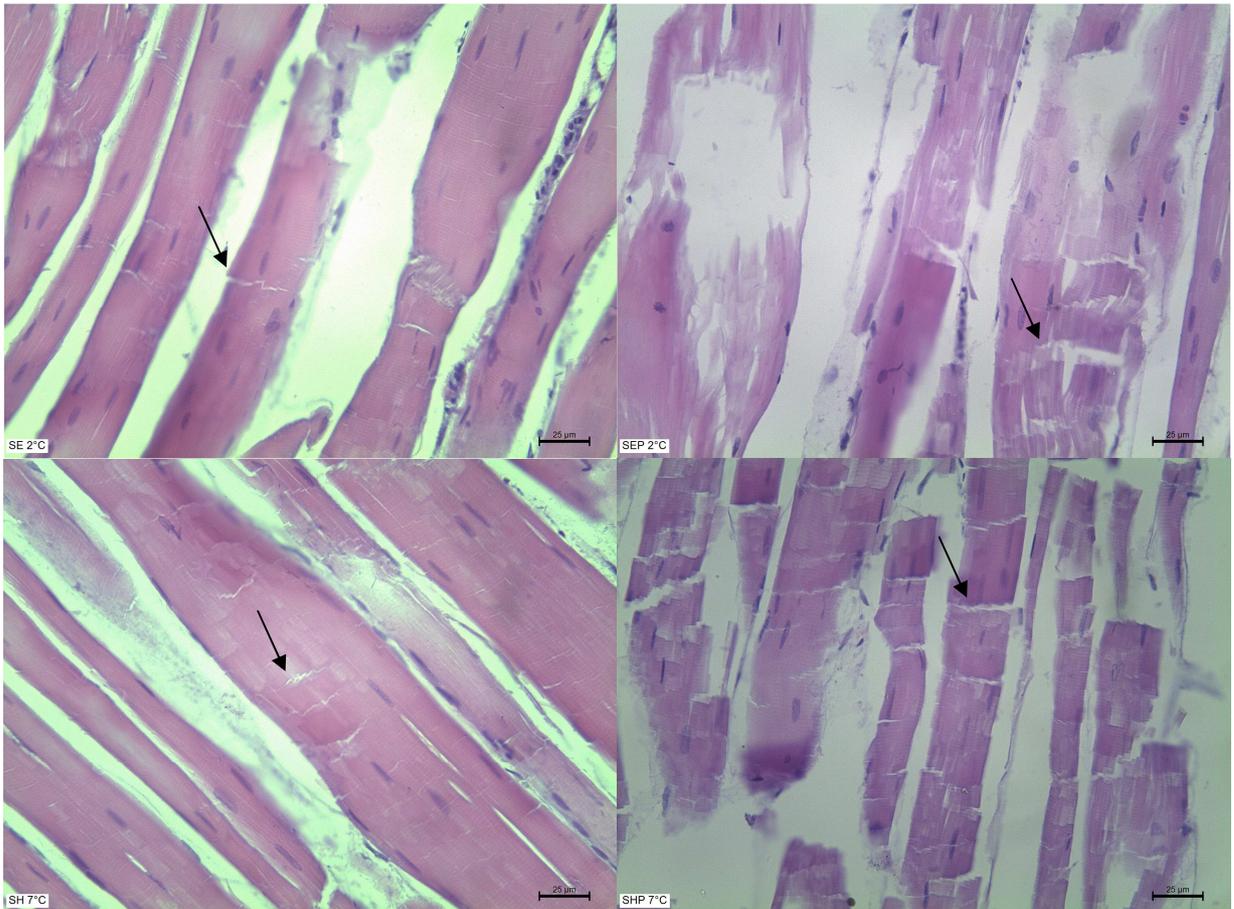


Figura 3 – Lesões nas fibras musculares estriadas esqueléticas dos blocos de peito de frango dos tratamentos SE e SEP a 2°C e dos tratamentos SH e SHP a 7°C.

Obs. As flechas indicam as áreas de ruptura do sarcolema das fibras.

Legenda: SE – *Salmonella* Enteritidis; SEP – *Salmonella* Enteritidis com psicotróficos; SH – *Salmonella* Heidelberg; SHP – *Salmonella* Heidelberg com psicotróficos.

Para avaliar a interferência do congelamento na migração de *Salmonella* sp. para o interior da carne de frango vinculou-se o tempo à temperatura e comparou-se as médias das contagens obtidas nos segmentos C dos seguintes binômios: 2°C/6h, 2°C/12h, 2°C/24h, 2°C/48h, 7°C/6h, 7°C/12h, 7°C/24h, 7°C/48h, -30°C/168h. Os binômios não diferiram estatisticamente entre si (tabela 3).

Esperava-se, através da fixação dos binômios de tempo-temperatura, encontrar uma condição de armazenamento mais adequada, que promovesse a inibição da penetração de *Salmonella* na carne de frango. Contudo, não foram observadas diferenças na penetração bacteriana em função do congelamento, apesar da possível

paralisação dos processos bacterianos metabólicos de *Salmonella* sp. em temperaturas baixas.

Tabela 3: Comparação das médias (em log) dos binômios de tempo-temperatura pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) no segmento C, para cada um dos tratamentos, de forma isolada.

Binômio	Tratamento			
	SE	SEP	SH	SHP
2°C/6h	7.089	6.698	6.988	7.302
2°C/12h	7.36	6.679	6.896	7.502
2°C/24h	7.700	7.156	7.941	7.320
2°C/48h	7.200	6.949	7.478	6.996
7°C/6h	7.252	6.623	6.104	7.304
7°C/12h	6.765	6.868	7.630	7.756
7°C/24h	7.533	6.959	7.773	6.555
7°C/48h	7.565	6.889	6.066	6.511
-30C/168h	7.339	6.587	7.140	6.837

Legenda: SE – *Salmonella* Enteritidis; SEP – *Salmonella* Enteritidis com psicotróficos; SH – *Salmonella* Heidelberg; SHP – *Salmonella* Heidelberg com psicotróficos.

Elmossalami e Wassef, em 1971, ao descrever sobre a taxa de penetração de algumas bactérias, dentre elas *Salmonella* Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrou que a temperatura interfere na migração de bactérias, sendo que a 30°C *S. Enteritidis* foi capaz de penetrar 5 cm para o interior da carne num período de 12 horas e 15cm num período de 36 horas. A 7°C e a -10°C a migração foi mais lenta, 3 cm em 12h e 10 cm em 36h. É importante salientar que apesar de existir uma grande lacuna entre as temperaturas de 7°C (refrigeração) e -10°C (congelamento), a migração de *S. Enteritidis* foi igual nas duas situações. Esses dados estão em consonância com o trabalho atual, em que não foram encontradas diferenças significativas para penetração de *Salmonella* sp. entre as temperaturas 2°C, 7°C e -30°C.

As análises histológicas por microscopia ótica simples evidenciaram lesão na estrutura celular das fibras musculares estriadas esqueléticas devido ao congelamento das amostras, observando-se diversos pontos de ruptura do sarcolema, principalmente no sentido transversal da fibra. Comparando-se amostras que foram previamente

congeladas com amostras que não passaram pelo processo de congelamento é possível verificar que o tecido que passou pelo processo de congelamento tem uma porcentagem de lesões significativamente maior que as amostras que não sofreram essa agressão (figura 4).

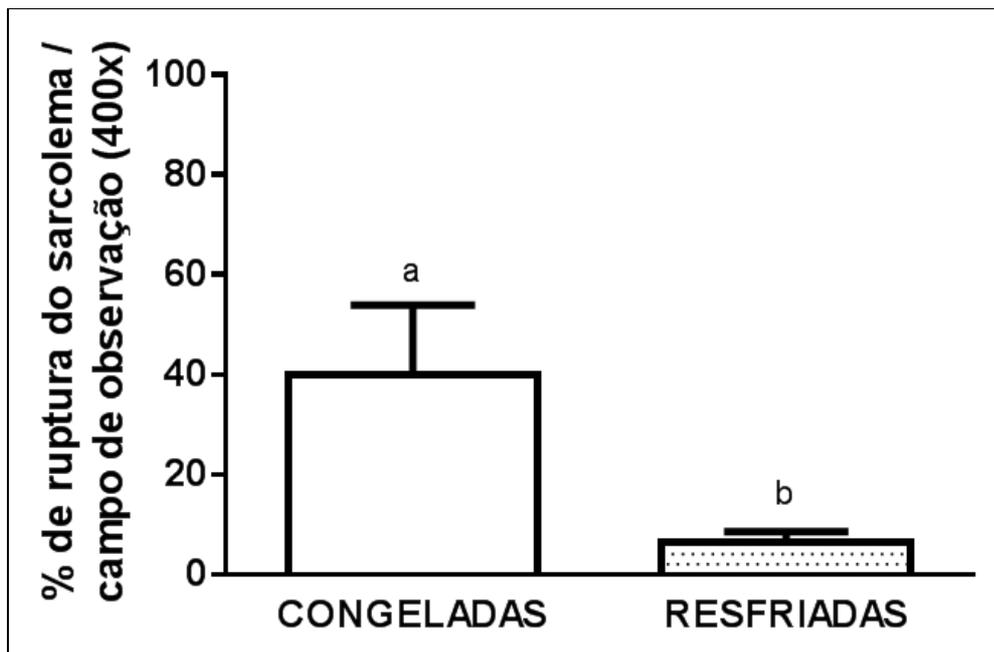


Figura 4. Comparação entre as porcentagens de ruptura do sarcolema entre o controle resfriado e controle congelado.

Além disso, as imagens dos cortes histológicos evidenciaram que o tecido das amostras congeladas estava bastante lesionado, fator que pode ter contribuído para eficiência da penetração, mesmo com redução do metabolismo microbiano, que não foi cessado completamente. Isso demonstra que a carne de frango possui uma estrutura pouco resistente à penetração bacteriana e que a degradação estrutural da carne, seja por fragmentação ou congelamento, torna-a ainda mais susceptível a proliferação microbiana (NORIEGA *et al*, 2010). A figura 5, a seguir, compara o tecido esquelético de peito de frango logo após o abate e de um dos peitos de frango utilizados no trabalho.

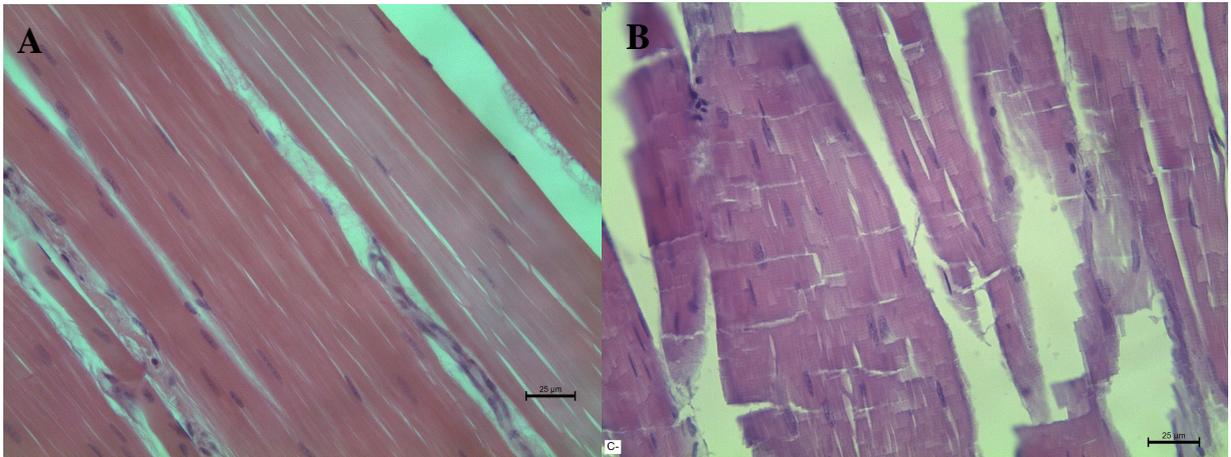


Figura 5 – Comparação entre cortes histológicos de peito de frango após o abate e peito de frango irradiado e congelado.

Legenda: A – fragmento de peito de frango após o abate. B - fragmento de peito de frango congelado e irradiado.

É importante salientar que as lesões de congelamento foram visualizadas em todos os grupos experimentais, pois, no presente trabalho, a carne de frango foi fragmentada para amostragem em blocos, além de ter sido adquirida congelada, ambos os fatores podem justificar a intensa migração bacteriana em curtos períodos de tempo mesmo em condições estressantes para as bactérias, como baixas temperaturas e competição microbiana. Ressalta-se que apesar da eficiência de migração de *Salmonella* sp. para o segmento C apenas uma porcentagem das bactérias conseguiu migrar. A tabela 4 exhibe a porcentagem de migração de *Salmonella* sp. para o segmento C, com base no inoculo inicial.

Os dados encontrados corroboram com Luber (2009), o qual teve como que mesmo em pequenas quantidades, as bactérias são capazes de penetrar para o interior da carne, locais conhecidos como “cold-points” que, na ocorrência de um tratamento térmico mais brando podem proporcionar um sub-processamento permitindo a sobrevivência de *Salmonella*. Além disso, Roccatto *et al* (2015) ao realizar diferentes tratamentos térmicos, semelhantes aos realizados em cozinhas domiciliares, em produtos a base de carne de aves (linguiças, hambúrgueres, etc.) contaminados artificialmente com *Salmonella* Typhimurium, concluíram que o preparo inadequado dos produtos mantem células viáveis da bactéria em seu interior e que o critério mais

utilizado em domicílios, o de observação visual, é inadequado devido a sua subjetividade.

Tabela 4 – Porcentagem de migração no segmento C, em relação ao inóculo inicial, para cada tempo e temperatura dos quatro tratamentos (SE, SH, SEP, SHP).

Temperatura	Tempo	Tratamento			
		SE %	SEP %	SH %	SHP %
2°C	6h	9,47%	3,73%	4,47%	10,41%
	12h	17,81%	4,18%	4,52%	15,73%
	24h	29,04%	8,31%	29,40%	11,94%
	48h	6,79%	4,77%	19,89%	6,86%
7°C	6h	9,91%	2,50%	0,41%	13,17%
	12h	2,49%	3,49%	31,10%	20,49%
	24h	12,28%	10,74%	27,22%	4,97%
	48h	35,81%	6,24%	0,71%	6,18%
-30°C	168h	22,89%	6,94%	12,85%	12,37%
Média Geral	-	16,28%	5,66%	14,51%	11,35%

Legenda: SE – *Salmonella* Enteritidis; SEP – *Salmonella* Enteritidis com psicrotróficos; SH – *Salmonella* Heidelberg; SHP – *Salmonella* Heidelberg com psicrotróficos.

Algumas amostras foram submetidas à MEV para visualização das células de *Salmonella* sp. no tecido da carne de frango (figura 6). As imagens 1, 2 e 3 são referentes às amostras inoculadas com *S. Heidelberg*, armazenadas a 7°C por 48 horas. Foi possível visualizar as células bacterianas nos segmentos A e C. Já as imagens 4, 5 e 6 dizem respeito à amostras armazenadas por 48 horas a 7°C e inoculadas com *S. Heidelberg* e psicrotróficos; as células bacterianas podem ser visualizadas nos três segmentos. Por último, 7, 8 e 9 são imagens referentes às amostras de inoculadas com *S. Enteritidis* (7°C por 24 horas), que pode ser visualizada apenas no segmento A.

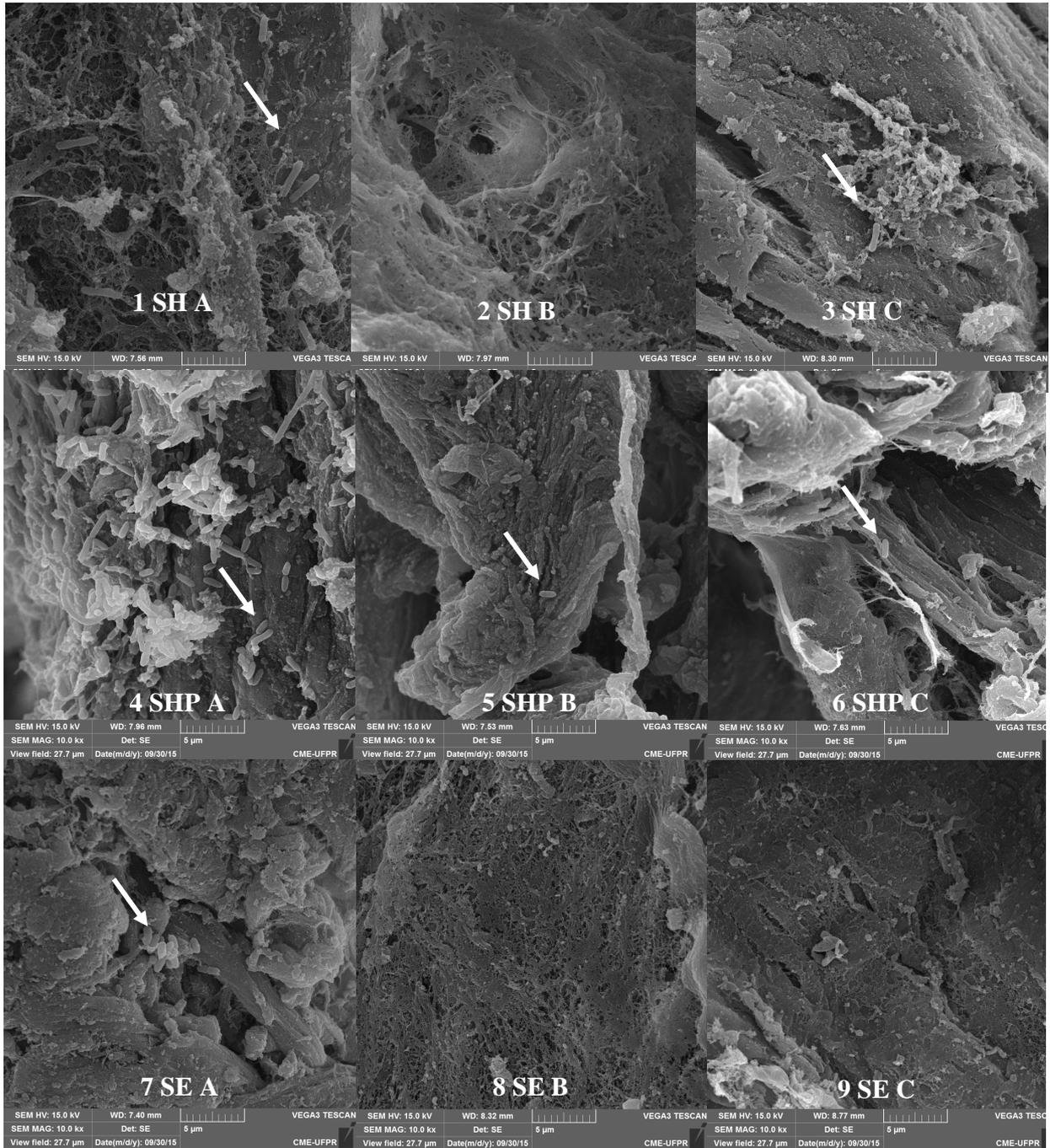


Figura 6. Eletromicrografias dos segmentos A, B e C de amostras dos tratamentos *S. Heidelberg*, *S. Heidelberg* com psicrotórficos e *S. Enteritidis*.

Legenda: **SH-A**. Segmento A do tratamento *Salmonella Heidelberg*. **SH-B**. Segmento B do tratamento *Salmonella Heidelberg*. **SH-C**. Segmento C do tratamento *Salmonella Heidelberg*. **SHP-A**. Segmento A do tratamento *Salmonella Heidelberg* + psicrotórficos. **SHP-B**. Segmento B do tratamento *Salmonella Heidelberg* + psicrotórficos. **SHP-C**. Segmento C do tratamento *Salmonella Heidelberg* + psicrotórficos. As células bacterianas podem ser visualizadas mais facilmente na direção das setas brancas.

5.5 Conclusões

Conclui-se que, nas condições impostas, *Salmonella* sp. foi capaz de migrar para o interior da carne de frango em apenas 6 horas, tendo seu pico de migração em 24h, sob refrigeração, não tendo ocorrido diferença na penetração de *Salmonella* sp. em função das temperaturas avaliadas nesse trabalho. O congelamento da carne não impediu a migração bacteriana, apesar da redução metabólica provocada pela baixa temperatura.

A presença de psicrotróficos proteolíticos, que simulou a microbiota deterioradora natural da carne, não auxiliou na migração de *Salmonella* sp. ao tecido, pelo contrário, foi observado um efeito inibitório na migração do sorovar *S. Enteritidis*. Apesar disso, na avaliação histológica, as amostras expostas aos tratamentos com adição de bactérias proteolíticas tiveram uma porcentagem maior de lesões nas fibras, sugerindo que, apesar do efeito benéfico de produção de proteases que rompem o tecido e facilitam a passagem de *Salmonella* sp, o efeito negativo, de competição bacteriana, é sobressalente.

A susceptibilidade da estrutura da carne de frango à invasão bacteriana e a capacidade de migração de *Salmonella* sp. chamam a atenção para o risco de consumo de carne subprocessada termicamente. Dessa forma, conhecendo-se a dificuldade de eliminação de *Salmonella* sp. da cadeia produtiva avícola, é de vital importância a realização de campanhas de educação sanitária para redução de surtos decorrentes desse patógeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CDC – Center for Disease Control and Prevention's. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: Annual Report**. USA: 2013

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — **Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2014**. USA: 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodnet/reports>>

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **EFSA Journal**. n.12(2):3547, 312 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3547. European Union: 2014.

ELMOSSALAMI, E.; WASSEF, N. Penetration of some Microorganisms in Meat. Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Reihe B-Journal Of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases Immunology Food Hygiene Veterinary Public Health – **ZBL. VET. MED. B**. v. 18. p. 329-336. Berlin and Hamburg: 1971.

FINSTAD, S.; O'BRYAN, C. A.; MARCY, J. A.; GRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. Salmonella and broiler processing in the United States: Relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**. USA: 2012.

GILL, C. O.; PENNEY. Penetration of bacteria into meat. **Applied and Environmental Microbiology**. vol. 33. n. 6. p. 1284-1286. New Zealand: 1977.

GILL, C. O.; LEET, N. G.; PENNEY, N. Structural Changes Developing with Rigor that Facilitate Bacterial Invasion of Muscle Tissue. **Meat science**. n. 10. p. 265-274. New Zealand: 1984.

HERMANN, S. Principais Pontos Críticos de Controle de Ciclo da *Salmonella* na Cadeia de Produção Avícola. **Anais do XIII Simpósio Brasil Sul de Avicultura e IV Brasil Sul Poultry Fair**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012.

JAY, M. J. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. São Paulo: An Aspen Publication, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier: 2002.

LUBER, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology**. v. 134. p. 21-28. Germany: 2009.

NORIEGA, E.; LACA, A.; DÍAZ, M. Decisive Role of Structure in Food Microbial Colonization and Implications for Predictive Microbiology. **Journal of Food Protection**. v. 73, n. 5. p. 938-951. USA: 2010.

ROCCATO, A.; UYTENDAELE, M.; CIBIN, V.; BARRUCCI, F.; CAPPÀ, V.; ZAYAGNIN, P.; LONGO, A.; RICCI, A. Survival of *Salmonella* Typhimurium in poultry-based meat preparations during grilling, frying and baking. **International Journal of Food Microbiology**. n.197. p.1–8. Italia: 2015.

SCOTT, M. R. **Controlling *Salmonella* in Poultry Production and Processing**. Taylor e Francis Group. United States: 2012.

THOMAS, C. J. ROURKE, R. D. O.; MCMEEKIN, T. A. Bacterial penetration of chicken breast muscle. **Food Microbiology**. n. 4. p. 87-95. Austrália: 1987.

WARSON, C. R.; ORTA-RAMIREZ, A.; MARKS, B. P.; RYSER, E. T.; BOOREN, A. M. Single Directional Migration of *Salmonella* into Marinated Whole Muscle Turkey Breast. **Journal of Food Protection**. vol. 71. n. 1. p. 153–156. USA: 2008.

WESSLING, C. R. **Penetração de *Salmonella* em Peitos de Frango Mantidos em Diferentes Temperaturas de Refrigeração e Relação com a Presença da Microbiota Deterioradora**. Dissertação do Programa de Mestrado Ciência Animal, da Universidade Federal do Paraná, Campus Palotina. Palotina: 2014.

6. CONCLUSÕES GERAIS

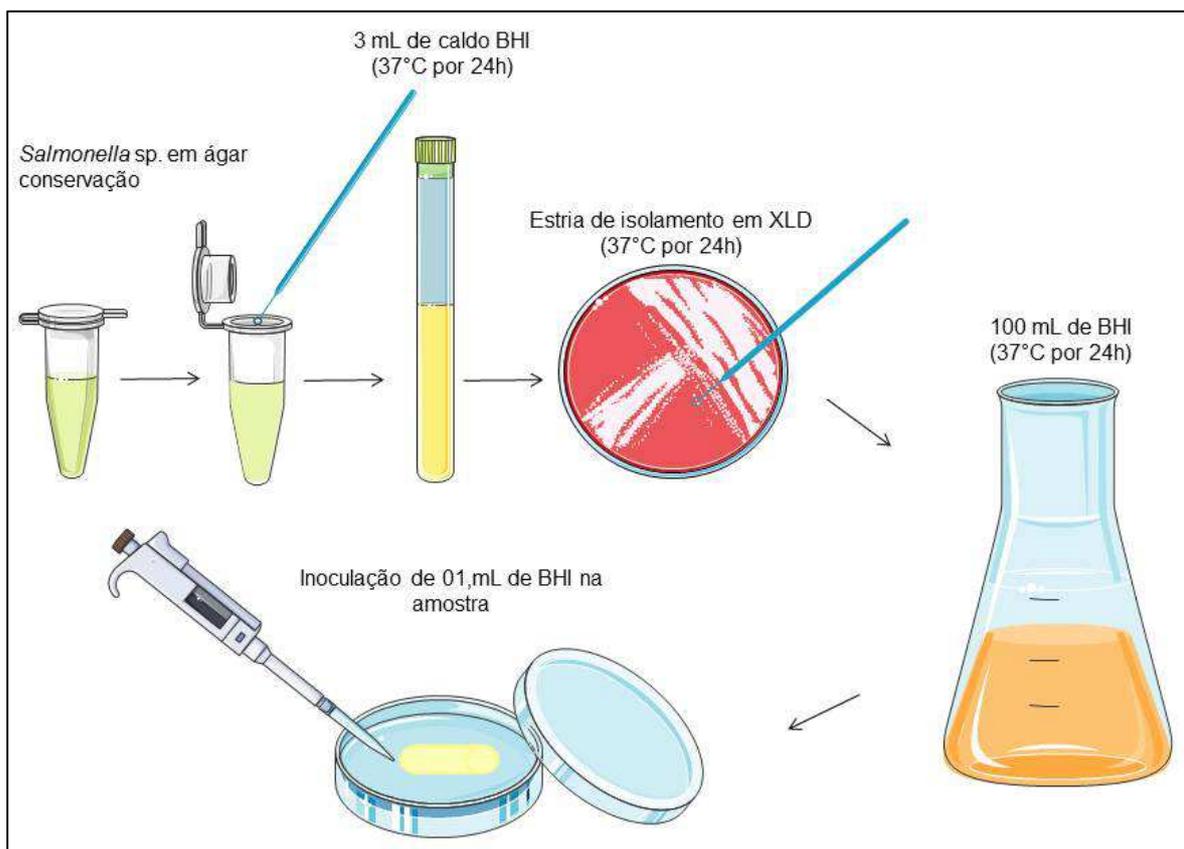
Salmonella sp. foi isolada de peitos de frango com pele e com osso tanto nos segmentos superficiais, como no interior da carne. No estudo realizado no capítulo “1”, os agentes deterioradores não demonstraram ter influência sobre a penetração de *Salmonella* sp, em contrapartida, a competição microbiana parece ter inibido o desenvolvimento do patógeno.

O experimento realizado no capítulo “2” demonstrou que bastam poucas horas para que a migração de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg aconteça, mesmo em temperaturas de refrigeração. Assim como no estudo realizado no capítulo 1, a presença de psicrotróficos proteolíticos não facilitou a invasão de *Salmonella* sp. ao tecido, pelo contrário, provocou efeito inibitório na migração do sorovar *S. Enteritidis*, apesar de provocar maior grau de lesões nas fibras da carne.

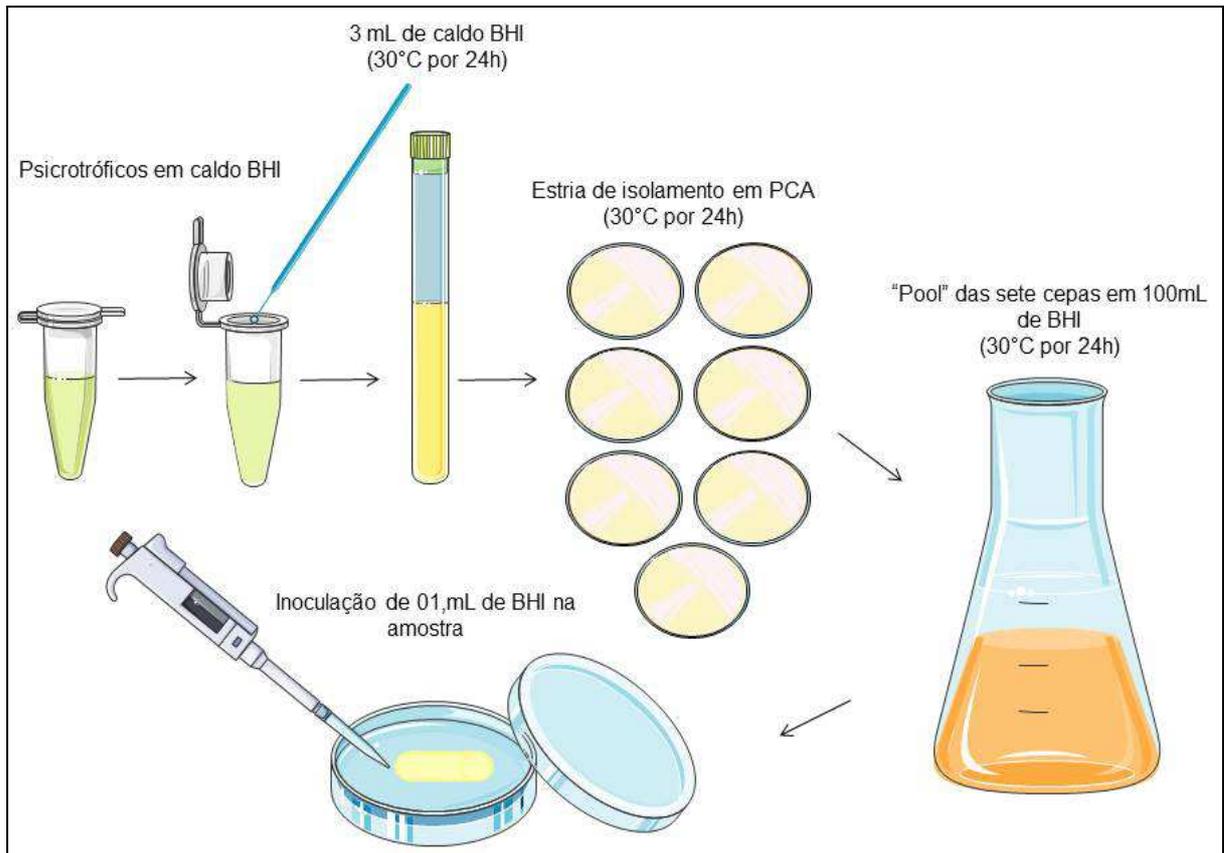
A susceptibilidade da estrutura da carne de frango à invasão bacteriana e a capacidade de migração de *Salmonella* sp. chamam a atenção para o risco do consumo de carne de frango subprocessada termicamente. Dessa forma, conhecendo-se a dificuldade de eliminação de *Salmonella* sp. da cadeia putiva avícola, é de vital importância a realização de campanhas de educação sanitária para redução de surtos decorrentes desse patógeno.

APÊNDICES

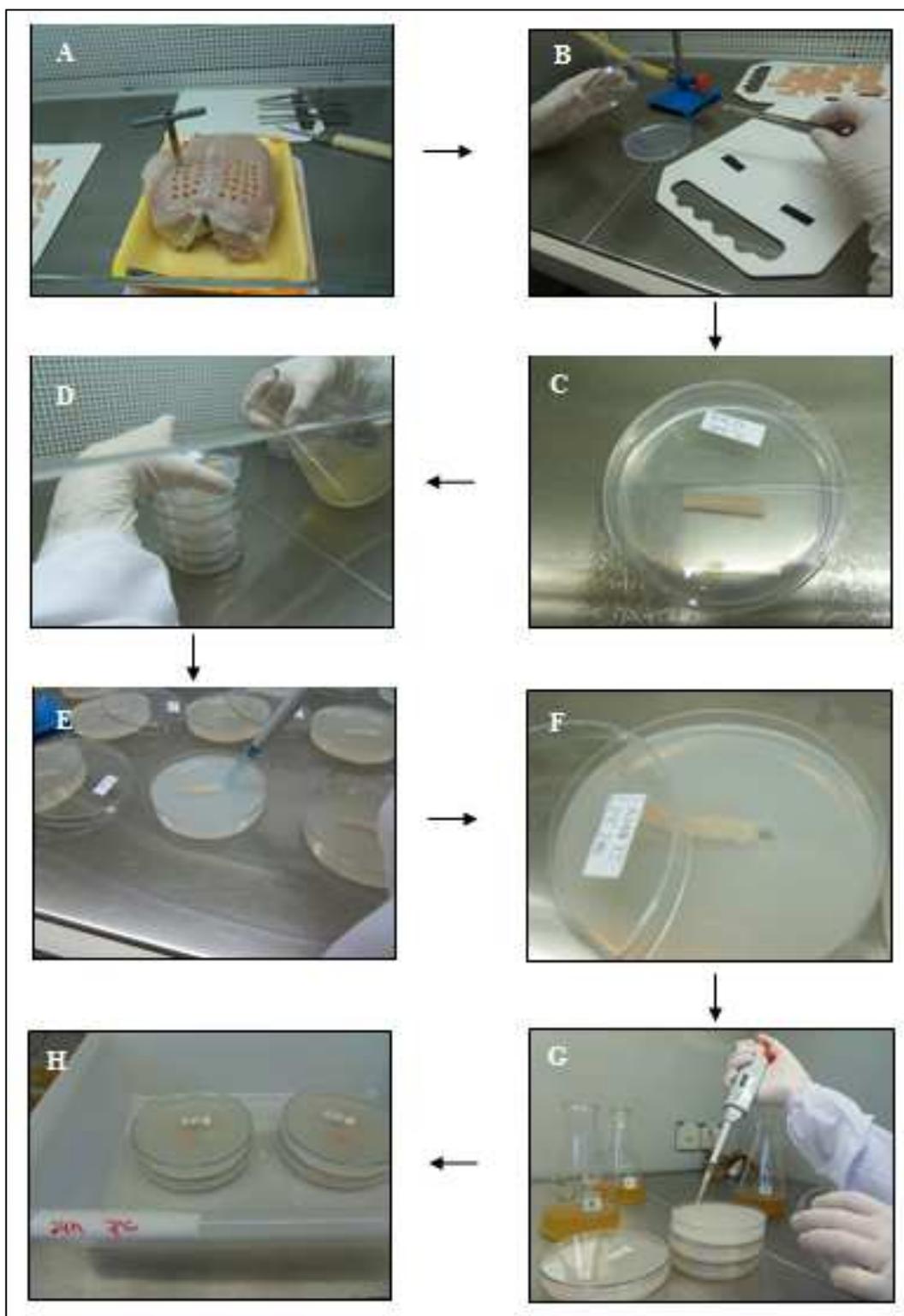
APÊNDICE 1 – ESQUEMA EXPLICATIVO DO INÓCULO DE *SALMONELLA* sp.



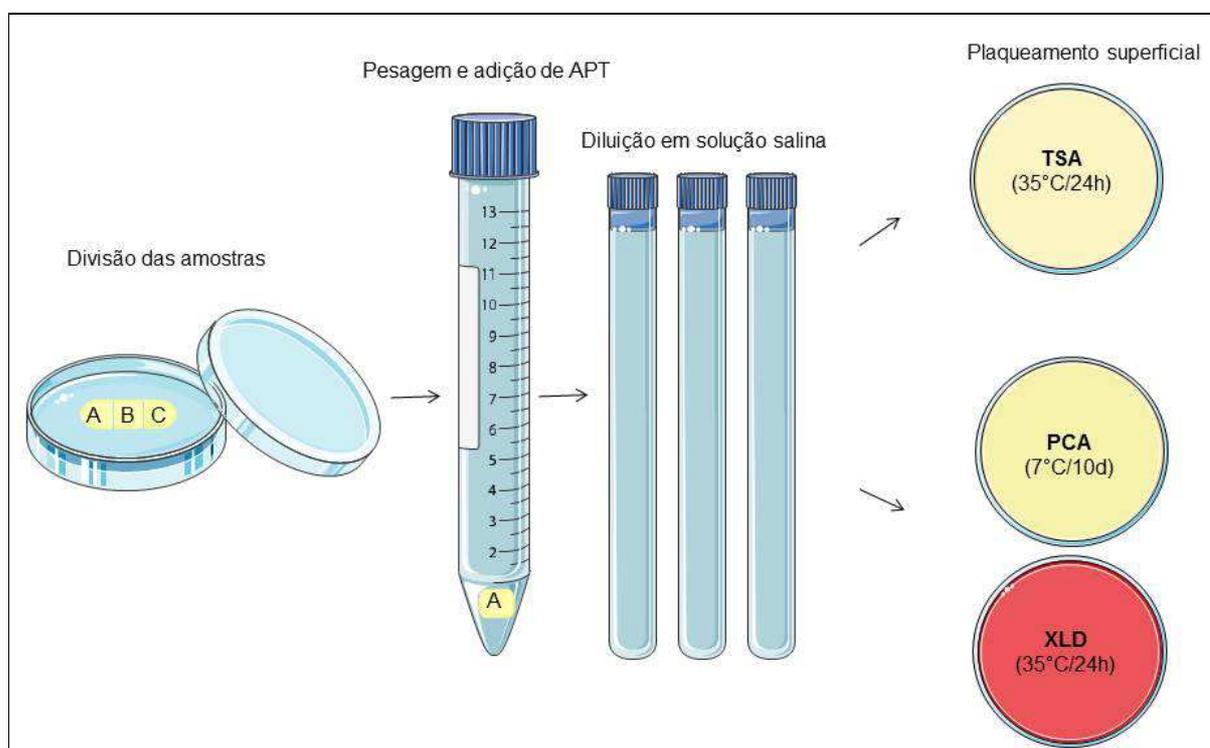
APÊNDICE 2 – ESQUEMA EXPLICATIVO INÓCULO DE PSICOTRÓFICOS PROTEOLÍTICOS



APÊNDICE 3 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PREPARO E INOCULAÇÃO DAS AMOSTRAS



APÊNDICE 4 – ESQUEMA EXPLICATIVO DA DIVISÃO, DILUIÇÃO E PLAQUEAMENTO DAS AMOSTRAS



APÊNDICE 5 – TABELA DO CONJUNTO DE DADOS BRUTOS

TRATAMENTO	TEMPERATURA	REPETIÇÃO	TEMPO	SEGMENTO	CONTAGEM
Se	2	1	6	a	8,633468
Se	2	2	6	a	7,96378783
Se	2	3	6	a	7,25527251
Se	2	4	6	a	8,50514998
Se	2	5	6	a	8,41497335
Se	2	6	6	a	7,90308999
Se	2	1	6	b	7,88081359
Se	2	2	6	b	7,36172784
Se	2	3	6	b	7,53275438
Se	2	4	6	b	7,98677173
Se	2	5	6	b	6,04139269
Se	2	6	6	b	7,39794001
Se	2	1	6	c	7,14612804
Se	2	2	6	c	6,32633586
Se	2	3	6	c	7,87506126
Se	2	4	6	c	7,78532984
Se	2	5	6	c	5,77815125
Se	2	6	6	c	7,62324929
Se	2	1	12	a	8,431364
Se	2	2	12	a	8,04139269
Se	2	3	12	a	8,07918125
Se	2	4	12	a	8,23044892
Se	2	5	12	a	7,77815125
Se	2	6	12	a	8,11394335
Se	2	1	12	b	8,25527251
Se	2	2	12	b	7,49136169
Se	2	3	12	b	7,30103
Se	2	4	12	b	7,61278386
Se	2	5	12	b	7,07918125
Se	2	6	12	b	7,75587486
Se	2	1	12	c	7,54406804
Se	2	2	12	c	7,81954394
Se	2	3	12	c	7,80617997
Se	2	4	12	c	5,69897
Se	2	5	12	c	7,32221929
Se	2	6	12	c	7,98677173
Se	2	1	24	a	8,342423
Se	2	2	24	a	8,30103
Se	2	3	24	a	8

Se	2	4	24	a	8,2787536
Se	2	5	24	a	8,35793485
se	2	6	24	a	8,14612804
se	2	1	24	b	8,17609126
se	2	2	24	b	7,73239376
se	2	3	24	b	8,20139712
se	2	4	24	b	7,50514998
se	2	5	24	b	7
se	2	6	24	b	7,90308999
se	2	1	24	c	7,98227123
se	2	2	24	c	7,79934055
se	2	3	24	c	8,16731733
se	2	4	24	c	6,84509804
se	2	5	24	c	7,34242268
se	2	6	24	c	8,06818586
se	2	1	48	a	8,278754
se	2	2	48	a	8,462398
se	2	3	48	a	8,19589965
se	2	4	48	a	8,16731733
se	2	5	48	a	9,17318627
se	2	6	48	a	7,93449845
se	2	1	48	b	7,93449845
se	2	2	48	b	7,77085201
se	2	3	48	b	8,05307844
se	2	4	48	b	6,10380372
se	2	5	48	b	7,14612804
se	2	6	48	b	7,98677173
se	2	1	48	c	7,23044892
se	2	2	48	c	7,63346846
se	2	3	48	c	7,69019608
se	2	4	48	c	6
se	2	5	48	c	6,75587486
se	2	6	48	c	7,8920946
se	7	1	6	a	8,322219
se	7	2	6	a	8,18469143
se	7	3	6	a	8,32633586
se	7	4	6	a	8,14612804
se	7	5	6	a	8,60205999
se	7	6	6	a	7,95424251
se	7	1	6	b	8,51851394
se	7	2	6	b	7,42975228
se	7	3	6	b	7,46686762
se	7	4	6	b	7,20411998

se	7	5	6	b	7,69019608
se	7	6	6	b	7,25527251
se	7	1	6	c	7,96378783
se	7	2	6	c	5,32221929
se	7	3	6	c	7,47712125
se	7	4	6	c	7,64345268
se	7	5	6	c	7,41497335
se	7	6	6	c	7,69019608
se	7	1	12	a	8,50515
se	7	2	12	a	8,17609126
se	7	3	12	a	8,34830486
se	7	4	12	a	8,38021124
se	7	5	12	a	8,462398
se	7	6	12	a	8,34242268
se	7	1	12	b	8,07918125
se	7	2	12	b	7,30103
se	7	3	12	b	7,66275783
se	7	4	12	b	7,04139269
se	7	5	12	b	7,34242268
se	7	6	12	b	5,84509804
se	7	1	12	c	7,70757018
se	7	2	12	c	6,32221929
se	7	3	12	c	7,90308999
se	7	4	12	c	6,07918125
se	7	5	12	c	7,5797836
se	7	6	12	c	5
se	7	1	24	a	8,30103
se	7	2	24	a	8,5563025
se	7	3	24	a	8,5797836
se	7	4	24	a	8,2787536
se	7	5	24	a	8,56820172
se	7	6	24	a	8,38021124
se	7	1	24	b	8
se	7	2	24	b	7,96848295
se	7	3	24	b	7,59106461
se	7	4	24	b	6,95904139
se	7	5	24	b	6,61278386
se	7	6	24	b	7,32221929
se	7	1	24	c	8,14612804
se	7	2	24	c	7,63346846
se	7	3	24	c	7,71600334
se	7	4	24	c	7,87040391
se	7	5	24	c	5,69897

se	7	6	24	c	8,13353891
se	7	1	48	a	8,176091
se	7	2	48	a	8,32221929
se	7	3	48	a	8,3283796
se	7	4	48	a	8,13672057
se	7	5	48	a	7,23044892
se	7	6	48	a	7,87506126
se	7	1	48	b	7,69897
se	7	2	48	b	7,44715803
se	7	3	48	b	7,74036269
se	7	4	48	b	7,69897
se	7	5	48	b	5,65321251
se	7	6	48	b	7,53147892
se	7	1	48	c	7,50514998
se	7	2	48	c	7,07918125
se	7	3	48	c	8,02938378
se	7	4	48	c	7,50514998
se	7	5	48	c	7,75587486
se	7	6	48	c	7,51851394
se	(-30)	1	168	a	8,414973
se	(-30)	2	168	a	7,98677173
se	(-30)	3	168	a	7,17609126
se	(-30)	4	168	a	8,13672057
se	(-30)	5	168	a	8,04921802
se	(-30)	6	168	a	8,11394335
se	(-30)	1	168	b	8
se	(-30)	2	168	b	7,98677173
se	(-30)	3	168	b	8,02530587
se	(-30)	4	168	b	7
se	(-30)	5	168	b	7,04139269
se	(-30)	6	168	b	7,04139269
se	(-30)	1	168	c	7,30103
se	(-30)	2	168	c	7,84509804
se	(-30)	3	168	c	8,36361198
se	(-30)	4	168	c	5,47712125
se	(-30)	5	168	c	7,20411998
se	(-30)	6	168	c	7,84509804
sh	2	1	6	a	8,69897
sh	2	2	6	a	7,96378783
sh	2	3	6	a	8,15533604
sh	2	4	6	a	8,38021124
sh	2	5	6	a	8,53147892
sh	2	6	6	a	8,30103

sh	2	1	6	b	9,11394335
sh	2	2	6	b	6,53147892
sh	2	3	6	b	5,77085201
sh	2	4	6	b	7,79934055
sh	2	5	6	b	5,69897
sh	2	6	6	b	7,88081359
sh	2	1	6	c	8,04139269
sh	2	2	6	c	6,50514998
sh	2	3	6	c	6,04139269
sh	2	4	6	c	8,45636603
sh	2	5	6	c	5
sh	2	6	6	c	7,88649073
sh	2	1	12	a	8,77815125
sh	2	2	12	a	8,41497335
sh	2	3	12	a	7,91907809
sh	2	4	12	a	8,20951501
sh	2	5	12	a	7,63346846
sh	2	6	12	a	8,49136169
sh	2	1	12	b	6,93951925
sh	2	2	12	b	7,59106461
sh	2	3	12	b	8,17609126
sh	2	4	12	b	7,39794001
sh	2	5	12	b	5,89762709
sh	2	6	12	b	7,38021124
sh	2	1	12	c	7,41497335
sh	2	2	12	c	7,73719264
sh	2	3	12	c	6,60205999
sh	2	4	12	c	8,14612804
sh	2	5	12	c	5,07918125
sh	2	6	12	c	6,39794001
sh	2	1	24	a	8,50514998
sh	2	2	24	a	8,43136376
sh	2	3	24	a	8,2787536
sh	2	4	24	a	8,47129171
sh	2	5	24	a	8,38021124
sh	2	6	24	a	8,77085201
sh	2	1	24	b	8,69897
sh	2	2	24	b	7,89762709
sh	2	3	24	b	8,10720997
sh	2	4	24	b	7,55990663
sh	2	5	24	b	7,5563025
sh	2	6	24	b	8,02938378
sh	2	1	24	c	7,8920946

sh	2	2	24	c	8,27415785
sh	2	3	24	c	7,96848295
sh	2	4	24	c	8,35602586
sh	2	5	24	c	7,2121876
sh	2	6	24	c	7,94448267
sh	2	1	48	a	8,14612804
sh	2	2	48	a	8,07918125
sh	2	3	48	a	8,34242268
sh	2	4	48	a	8,07918125
sh	2	5	48	a	7,95424251
sh	2	6	48	a	8,47712125
sh	2	1	48	b	7,77085201
sh	2	2	48	b	7,47712125
sh	2	3	48	b	7,11394335
sh	2	4	48	b	8,17609126
sh	2	5	48	b	7,76342799
sh	2	6	48	b	7,92427929
sh	2	1	48	c	7,97772361
sh	2	2	48	c	7,72427587
sh	2	3	48	c	8,23552845
sh	2	4	48	c	8,61700034
sh	2	5	48	c	5,47712125
sh	2	6	48	c	6,83884909
sh	7	1	6	a	9,07918125
sh	7	2	6	a	8,1931246
sh	7	3	6	a	7,81954394
sh	7	4	6	a	8,5797836
sh	7	5	6	a	8,75587486
sh	7	6	6	a	8,54406804
sh	7	1	6	b	6,53147892
sh	7	2	6	b	7,23044892
sh	7	3	6	b	7,36172784
sh	7	4	6	b	7,462398
sh	7	5	6	b	6,61278386
sh	7	6	6	b	7,41497335
sh	7	1	6	c	4,69897
sh	7	2	6	c	6,56820172
sh	7	3	6	c	5,11394335
sh	7	4	6	c	7,5563025
sh	7	5	6	c	6
sh	7	6	6	c	6,69019608
sh	7	1	12	a	8,65321251
sh	7	2	12	a	8,24054925

sh	7	3	12	a	7,41497335
sh	7	4	12	a	8,14921911
sh	7	5	12	a	7,98677173
sh	7	6	12	a	8,38021124
sh	7	1	12	b	8,07918125
sh	7	2	12	b	8,11394335
sh	7	3	12	b	7,25527251
sh	7	4	12	b	6,11394335
sh	7	5	12	b	7,32221929
sh	7	6	12	b	7,8920946
sh	7	1	12	c	8,32221929
sh	7	2	12	c	8,07554696
sh	7	3	12	c	8,02938378
sh	7	4	12	c	6
sh	7	5	12	c	7,11394335
sh	7	6	12	c	8,24054925
sh	7	1	24	a	8,92427929
sh	7	2	24	a	8,5563025
sh	7	3	24	a	7,81291336
sh	7	4	24	a	8,74818803
sh	7	5	24	a	8
sh	7	6	24	a	7,99122608
sh	7	1	24	b	7,84509804
sh	7	2	24	b	7,8260748
sh	7	3	24	b	7,51851394
sh	7	4	24	b	8,38916608
sh	7	5	24	b	8,0211893
sh	7	6	24	b	6,46089784
sh	7	1	24	c	7,2787536
sh	7	2	24	c	8,13033377
sh	7	3	24	c	7,83250891
sh	7	4	24	c	8,23552845
sh	7	5	24	c	8,32014629
sh	7	6	24	c	6,84509804
sh	7	1	48	a	8,44715803
sh	7	2	48	a	8,5563025
sh	7	3	48	a	7,79934055
sh	7	4	48	a	8,21484385
sh	7	5	48	a	7,91381385
sh	7	6	48	a	8,37474835
sh	7	1	48	b	7,65321251
sh	7	2	48	b	8,25042
sh	7	3	48	b	7,61278386

sh	7	4	48	b	5,97312785
sh	7	5	48	b	4,77815125
sh	7	6	48	b	8,10380372
sh	7	1	48	c	7,69897
sh	7	2	48	c	5,84509804
sh	7	3	48	c	5,60205999
sh	7	4	48	c	2,90308999
sh	7	5	48	c	6,1430148
sh	7	6	48	c	8,20411998
sh	(-30)	1	168	a	7,96378783
sh	(-30)	2	168	a	7,80617997
sh	(-30)	3	168	a	8,15836249
sh	(-30)	4	168	a	8,04139269
sh	(-30)	5	168	a	7,89762709
sh	(-30)	6	168	a	8,32221929
sh	(-30)	1	168	b	7,8920946
sh	(-30)	2	168	b	7,80617997
sh	(-30)	3	168	b	7,79934055
sh	(-30)	4	168	b	7,60205999
sh	(-30)	5	168	b	7,49136169
sh	(-30)	6	168	b	7,49136169
sh	(-30)	1	168	c	7,89762709
sh	(-30)	2	168	c	6,11394335
sh	(-30)	3	168	c	7,84509804
sh	(-30)	4	168	c	7,17318627
sh	(-30)	5	168	c	7,69897
sh	(-30)	6	168	c	6,11394335
sep	2	1	6	a	8,07918125
sep	2	2	6	a	7,81291336
sep	2	3	6	a	8,68124124
sep	2	4	6	a	8,2787536
sep	2	5	6	a	7,61278386
sep	2	6	6	a	8,29666519
sep	2	1	6	b	8,25527251
sep	2	2	6	b	6,51851394
sep	2	3	6	b	6,50514998
sep	2	4	6	b	7,34242268
sep	2	5	6	b	6,49554434
sep	2	6	6	b	7,11394335
sep	2	1	6	c	7,8573325
sep	2	2	6	c	5,90308999
sep	2	3	6	c	5,95424251
sep	2	4	6	c	6,59106461

sep	2	5	6	c	6,84509804
sep	2	6	6	c	7,04139269
sep	2	1	12	a	8,36172784
sep	2	2	12	a	8
sep	2	3	12	a	8,28103337
sep	2	4	12	a	7,77815125
sep	2	5	12	a	8,23044892
sep	2	6	12	a	7,69897
sep	2	1	12	b	7,71600334
sep	2	2	12	b	7,54406804
sep	2	3	12	b	6,36172784
sep	2	4	12	b	6,69897
sep	2	5	12	b	6,60205999
sep	2	6	12	b	7,20411998
sep	2	1	12	c	7,14612804
sep	2	2	12	c	7,59106461
sep	2	3	12	c	4,83632412
sep	2	4	12	c	7,30103
sep	2	5	12	c	5,47712125
sep	2	6	12	c	7,72427587
sep	2	1	24	a	8,2787536
sep	2	2	24	a	8,25527251
sep	2	3	24	a	8,44247977
sep	2	4	24	a	8,03342376
sep	2	5	24	a	8,41161971
sep	2	6	24	a	8
sep	2	1	24	b	7,43136376
sep	2	2	24	b	5,60205999
sep	2	3	24	b	7,462398
sep	2	4	24	b	8,00860017
sep	2	5	24	b	7,89762709
sep	2	6	24	b	7,04139269
sep	2	1	24	c	7,30103
sep	2	2	24	c	6,51851394
sep	2	3	24	c	7,72427587
sep	2	4	24	c	7,83250891
sep	2	5	24	c	7,86332286
sep	2	6	24	c	5,69897
sep	2	1	48	a	8,69019608
sep	2	2	48	a	8,2787536
sep	2	3	48	a	8,30749604
sep	2	4	48	a	8,2787536
sep	2	5	48	a	7,93951925

sep	2	6	48	a	8,13353891
sep	2	1	48	b	6,462398
sep	2	2	48	b	7,23044892
sep	2	3	48	b	7,39794001
sep	2	4	48	b	7,2787536
sep	2	5	48	b	3,97312785
sep	2	6	48	b	7,74818803
sep	2	1	48	c	6,97772361
sep	2	2	48	c	7,15533604
sep	2	3	48	c	7,96378783
sep	2	4	48	c	7,30103
sep	2	5	48	c	4,90308999
sep	2	6	48	c	7,39794001
sep	7	1	6	a	8,86923172
sep	7	2	6	a	7,79934055
sep	7	3	6	a	7,84509804
sep	7	4	6	a	8,25527251
sep	7	5	6	a	8,65321251
sep	7	6	6	a	7,93449845
sep	7	1	6	b	9,20411998
sep	7	2	6	b	7,68124124
sep	7	3	6	b	5,75587486
sep	7	4	6	b	7,25527251
sep	7	5	6	b	6,91381385
sep	7	6	6	b	4,30103
sep	7	1	6	c	8,04139269
sep	7	2	6	c	7,11394335
sep	7	3	6	c	6,65321251
sep	7	4	6	c	7,25527251
sep	7	5	6	c	7,02530587
sep	7	6	6	c	3,65321251
sep	7	1	12	a	9,462398
sep	7	2	12	a	8
sep	7	3	12	a	7,49637605
sep	7	4	12	a	8
sep	7	5	12	a	8,74036269
sep	7	6	12	a	8,25527251
sep	7	1	12	b	7,23044892
sep	7	2	12	b	6,90308999
sep	7	3	12	b	7,64345268
sep	7	4	12	b	7,23044892
sep	7	5	12	b	8,14921911
sep	7	6	12	b	7,53147892

sep	7	1	12	c	7,04139269
sep	7	2	12	c	6,76342799
sep	7	3	12	c	7,61278386
sep	7	4	12	c	7,43136376
sep	7	5	12	c	5
sep	7	6	12	c	7,36172784
sep	7	1	24	a	7,47712125
sep	7	2	24	a	7,60205999
sep	7	3	24	a	8,12057393
sep	7	4	24	a	8,17609126
sep	7	5	24	a	8,15228834
sep	7	6	24	a	8,04139269
sep	7	1	24	b	6,64345268
sep	7	2	24	b	8,06818586
sep	7	3	24	b	8,1172713
sep	7	4	24	b	8
sep	7	5	24	b	7,44715803
sep	7	6	24	b	7,20411998
sep	7	1	24	c	4,25527251
sep	7	2	24	c	7,83250891
sep	7	3	24	c	8,00860017
sep	7	4	24	c	7,97772361
sep	7	5	24	c	6,60205999
sep	7	6	24	c	7,07918125
sep	7	1	48	a	8,63346846
sep	7	2	48	a	7,61278386
sep	7	3	48	a	7,66275783
sep	7	4	48	a	8,2787536
sep	7	5	48	a	8
sep	7	6	48	a	8,38021124
sep	7	1	48	b	5,77085201
sep	7	2	48	b	6,11394335
sep	7	3	48	b	7,32221929
sep	7	4	48	b	7,2787536
sep	7	5	48	b	7,34242268
sep	7	6	48	b	7,8260748
sep	7	1	48	c	5,60205999
sep	7	2	48	c	6,20411998
sep	7	3	48	c	7,12385164
sep	7	4	48	c	7,32221929
sep	7	5	48	c	7,32221929
sep	7	6	48	c	7,76342799
sep	(-30)	1	168	a	8,20411998

sep	(-30)	2	168	a	7,462398
sep	(-30)	3	168	a	7,56820172
sep	(-30)	4	168	a	8,31806333
sep	(-30)	5	168	a	7,5797836
sep	(-30)	6	168	a	7,34242268
sep	(-30)	1	168	b	7,74818803
sep	(-30)	2	168	b	7,462398
sep	(-30)	3	168	b	7,44715803
sep	(-30)	4	168	b	7
sep	(-30)	5	168	b	6,84509804
sep	(-30)	6	168	b	6,84509804
sep	(-30)	1	168	c	7,70757018
sep	(-30)	2	168	c	6,51851394
sep	(-30)	3	168	c	7,60205999
sep	(-30)	4	168	c	4,69897
sep	(-30)	5	168	c	6,47712125
sep	(-30)	6	168	c	6,51851394
shp	2	1	6	a	8,88649073
shp	2	2	6	a	8,27184161
shp	2	3	6	a	8,32221929
shp	2	4	6	a	8,17318627
shp	2	5	6	a	7,66275783
shp	2	6	6	a	8,39093511
shp	2	1	6	b	8,11394335
shp	2	2	6	b	7,67209786
shp	2	3	6	b	7,74818803
shp	2	4	6	b	8,11394335
shp	2	5	6	b	7,23044892
shp	2	6	6	b	7,69019608
shp	2	1	6	c	9,11394335
shp	2	2	6	c	7,20411998
shp	2	3	6	c	6,30103
shp	2	4	6	c	6,30103
shp	2	5	6	c	7,11394335
shp	2	6	6	c	7,77815125
shp	2	1	12	a	9,25527251
shp	2	2	12	a	8,25527251
shp	2	3	12	a	7,95424251
shp	2	4	12	a	8,41497335
shp	2	5	12	a	7,77815125
shp	2	6	12	a	8,17609126
shp	2	1	12	b	7,30103
shp	2	2	12	b	7,49136169

shp	2	3	12	b	8,04139269
shp	2	4	12	b	7,2787536
shp	2	5	12	b	7,17609126
shp	2	6	12	b	7,66275783
shp	2	1	12	c	7,86923172
shp	2	2	12	c	7,47712125
shp	2	3	12	c	6,51851394
shp	2	4	12	c	7,50514998
shp	2	5	12	c	7,36172784
shp	2	6	12	c	8,28330123
shp	2	1	24	a	8,75587486
shp	2	2	24	a	8,34242268
shp	2	3	24	a	7,81291336
shp	2	4	24	a	8,34242268
shp	2	5	24	a	8,04139269
shp	2	6	24	a	8,16731733
shp	2	1	24	b	8,41497335
shp	2	2	24	b	7,41497335
shp	2	3	24	b	5,04139269
shp	2	4	24	b	8,18184359
shp	2	5	24	b	7,5563025
shp	2	6	24	b	7,75587486
shp	2	1	24	c	8
shp	2	2	24	c	7,32221929
shp	2	3	24	c	6,84509804
shp	2	4	24	c	6,60205999
shp	2	5	24	c	7,66275783
shp	2	6	24	c	7,49136169
shp	2	1	48	a	8,83250891
shp	2	2	48	a	7,99122608
shp	2	3	48	a	8,25527251
shp	2	4	48	a	8,2787536
shp	2	5	48	a	7,49136169
shp	2	6	48	a	8,11058971
shp	2	1	48	b	8,2787536
shp	2	2	48	b	7,19865709
shp	2	3	48	b	6,2787536
shp	2	4	48	b	7,36172784
shp	2	5	48	b	7,36172784
shp	2	6	48	b	6,98677173
shp	2	1	48	c	6,81954394
shp	2	2	48	c	7,65321251
shp	2	3	48	c	5,30103

shp	2	4	48	c	7,14612804
shp	2	5	48	c	7,04139269
shp	2	6	48	c	8,01703334
shp	7	1	6	a	8,11394335
shp	7	2	6	a	7,83884909
shp	7	3	6	a	8,38381537
shp	7	4	6	a	8,07188201
shp	7	5	6	a	8,44715803
shp	7	6	6	a	8,25527251
shp	7	1	6	b	8,07918125
shp	7	2	6	b	6,77815125
shp	7	3	6	b	6,47712125
shp	7	4	6	b	8,22271647
shp	7	5	6	b	7,07918125
shp	7	6	6	b	7,95904139
shp	7	1	6	c	7,80617997
shp	7	2	6	c	4,77815125
shp	7	3	6	c	7,51851394
shp	7	4	6	c	8,02694163
shp	7	5	6	c	7,5563025
shp	7	6	6	c	8,1430148
shp	7	1	12	a	8,78532984
shp	7	2	12	a	8,30103
shp	7	3	12	a	8,50514998
shp	7	4	12	a	8,53147892
shp	7	5	12	a	8,04139269
shp	7	6	12	a	8,50514998
shp	7	1	12	b	7,79934055
shp	7	2	12	b	7,79239169
shp	7	3	12	b	6,67209786
shp	7	4	12	b	6,90308999
shp	7	5	12	b	6,68124124
shp	7	6	12	b	7,90848502
shp	7	1	12	c	8,41497335
shp	7	2	12	c	8,04139269
shp	7	3	12	c	8,17609126
shp	7	4	12	c	6
shp	7	5	12	c	7,64345268
shp	7	6	12	c	8,26245109
shp	7	1	24	a	7,60205999
shp	7	2	24	a	6,69897
shp	7	3	24	a	7,73239376
shp	7	4	24	a	8,59106461

shp	7	5	24	a	7,90308999
shp	7	6	24	a	8,62324929
shp	7	1	24	b	6,95424251
shp	7	2	24	b	7,2787536
shp	7	3	24	b	7,53147892
shp	7	4	24	b	6,86923172
shp	7	5	24	b	7,51851394
shp	7	6	24	b	8,51054501
shp	7	1	24	c	7,96378783
shp	7	2	24	c	7,68124124
shp	7	3	24	c	2,47712125
shp	7	4	24	c	5,30103
shp	7	5	24	c	7,92941893
shp	7	6	24	c	7,97772361
shp	7	1	48	a	7,66275783
shp	7	2	48	a	8,1931246
shp	7	3	48	a	7,90308999
shp	7	4	48	a	8,14612804
shp	7	5	48	a	7,41497335
shp	7	6	48	a	7
shp	7	1	48	b	7,23044892
shp	7	2	48	b	6,63346846
shp	7	3	48	b	7,23044892
shp	7	4	48	b	5,90308999
shp	7	5	48	b	6,30103
shp	7	6	48	b	7,63346846
shp	7	1	48	c	6,11394335
shp	7	2	48	c	7,16731733
shp	7	3	48	c	5,47712125
shp	7	4	48	c	5,69897
shp	7	5	48	c	7,04139269
shp	7	6	48	c	7,56820172
shp	(-30)	1	168	a	8,36172784
shp	(-30)	2	168	a	7,65321251
shp	(-30)	3	168	a	7,34242268
shp	(-30)	4	168	a	7,47712125
shp	(-30)	5	168	a	8
shp	(-30)	6	168	a	7,63346846
shp	(-30)	1	168	b	8,17609126
shp	(-30)	2	168	b	7,65321251
shp	(-30)	3	168	b	4,60205999
shp	(-30)	4	168	b	7,11394335
shp	(-30)	5	168	b	6,43136376

shp	(-30)	6	168	b	6,43136376
shp	(-30)	1	168	c	8,04139269
shp	(-30)	2	168	c	5,94448267
shp	(-30)	3	168	C	7,70757018
shp	(-30)	4	168	C	7,04139269
shp	(-30)	5	168	C	6,34242268
shp	(-30)	6	168	C	5,94448267

ANEXOS

ANEXO 1 – CERTIFICADO DE DOSIMETRIA



São Paulo, 19 de Setembro de 2014.

CERTIFICADO DE DOSIMETRIA

Certificado: LDP1 - 437/2014
 Amostra: Peitos de frango congelados.
 Quantidade: 2 caixas
 Irradiação em: 19/09/2014
 Dose Solicitada: >10kGy.
 Tempo de Irradiação: 2h30min
 Instalação Radiativa: Irradiador Multipropósito
 Irradiação estática: 2 cm no protetor da fonte
 Dosímetro: Amher Perspectives 3042 Batch V - 6113006
 Equipamento: Espectrolômetro Genesis 70 (2)
 Solicitante: Kamila Tozzo (aluna do Prof. Luciano dos Santos Barros)
 LACOMA/DCVU/FPR

Dosímetro n°	1° Ciclo(2D)		Dose ¹ (kGy) mínima
	12h(10min/2°)		
	Posição(1°)	Dose ² (kGy)	
II - meio	6 e 7	11,5	11,5
II - T		11,9	11,9

1ª Autoridade de Defesa da Vida: Instituições em conformidade com o Serviço
 Internacional de Unidades de Tempo e Massa, e o Serviço Internacional de Unidades de Tempo e Massa, e o Serviço Internacional de Unidades de Tempo e Massa.


 MSc. Celso Roberto Neri, FPR
 Pesquisadora Responsável

Laboratório de Dosimetria em Processos de Irradiação
 Divisão de Pesquisa e Desenvolvimento
 Centro de Tecnologia das Radiações
 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Av. Prof. Lineu César, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-900

Fone: 11 3133-9876 ou 3133-9878 Fax: 11 3133-9765

São Paulo - Estado de São Paulo
 e-mail: cern@ipen.br