

**CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO EM HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO
DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

CLEISE DE OLIVEIRA SIGARINI

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DA CARNE BOVINA DESOSSADA EM
ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS DO MUNICÍPIO DE CUIABÁ – MT/
BRASIL**

NITERÓI/RJ

2004

CLEISE DE OLIVEIRA SIGARINI

**AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DA CARNE BOVINA DESOSSADA EM
ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS DO MUNICÍPIO DE CUIABÁ – MT/ BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. Robson Maia Franco

NITERÓI/RJ

2004

CLEISE DE OLIVEIRA SIGARINI

AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA DA CARNE BOVINA DESOSSADA EM ESTABELECIMENTOS COMERCIAIS DO MUNICÍPIO DE CUIABÁ – MT/ BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Aprovada em de abril de 2004

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. Robson Maia Franco
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. João Garcia Caramori Júnior
Universidade Federal de Mato-Grosso - UFMT

NITERÓI/RJ

2004

A DEUS por tornar tudo possível.

Ao meu companheiro Alysson Sander de Souza, com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me carregado em seus braços nos momentos que mais precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Antônio Trindade de Oliveira –pela orientação, apoio, incentivo e pela confiança em mim depositada.

Ao doutorando Edivaldo Sampaio de Almeida Filho – pelos conselhos e por todas as suas orientações, durante esse seis anos de convivência e amizade.

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco pela co-orientação e por todas as sugestões feitas durante a confecção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Teófilo José Pimentel da Silva por todas as sugestões e colaborações para confecção deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Mônica Queiroz de Freitas e Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz Monteiro pelo auxílio estatístico.

Ao Prof. Dr. Zander Barreto de Miranda pelo incentivo e sugestões para realização desta pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Eliana de Fátima Marques de Mesquita pelo ajuda do vernáculo em língua estrangeira.

Ao Prof. José Ricardo de Souza, Diretor do Hospital Veterinário da UFMT pelo espaço cedido para realização da parte prática desta pesquisa.

À minha mãe, Arlete B. de Oliveira por seu exemplo de dedicação, estudo e persistência profissional, e pelo incentivo ao meu crescimento pessoal e profissional.

Ao meu companheiro, amigo e confidente, Alysson Sander de Souza pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões profissionais, pelo incentivo e pelas palavras amigas nos momentos de angústia.

Ao Eduardo Eustáquio de Figueiredo pela dedicação e colaboração durante a realização da parte prática desta Dissertação.

À doutoranda Carolina Riscado Pombo pela consideração e pelo auxílio na computação gráfica.

Ao mestrando Marivaldo Rodrigues Figueiró pela colaboração na parte estatística deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na elaboração desta Dissertação.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.” (Chico Xavier)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 9

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS, p. 11

RESUMO, p. 13

ABSTRACT, p. 14

1 INTRODUÇÃO, p. 15

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 17

2.1 FATORES QUE INFLUENCIAM O ESTADO DE CONSERVAÇÃO DA CARNE BOVINA, p. 18

2.2 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CONSUMO DE PRODUTOS CÁRNEOS, p.24

2.3 TAXONOMIA, CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E COMPORTAMENTO FENOTÍPICO DA *Salmonella* spp, p. 27

2.4 IMPORTÂNCIA DA *Salmonella* spp EM SAÚDE PÚBLICA, p. 29

2.5 EPIDEMIOLOGIA DA *Salmonella* spp, p. 31

2.6 MECANISMO DE PATOGENICIDADE, p. 33

2.7 QUADRO CLÍNICO, p. 34

2.8 MEDIDAS PREVENTIVAS, p. 35

2.9 TAXONOMIA, CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E COMPORTAMENTO FENOTÍPICO DA *Escherichia coli*, p. 37

2.10 IMPORTÂNCIA DA *Escherichia coli* EM SAÚDE PÚBLICA, p. 37

2.11 EPIDEMIOLOGIA DA *Escherichia coli*, p. 38

2.12 MECANISMO DE PATOGENICIDADE, p. 39

2.13 QUADRO CLÍNICO, p. 41

2.14 MEDIDAS PREVENTIVAS, p. 42

2.15 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA NA CARNE, p. 44

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 46

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS, p. 46

3.2 AMOSTRAGEM, p. 47

3.3 TÉCNICA DE AFERIÇÃO DE TEMPERATURA DAS MEIAS-CARCAÇAS, p. 47

3.4 TÉCNICA DE AFERIÇÃO DO POTENCIAL HIDROGÊNIO-IÔNICO (pH) DAS MEIAS-CARCAÇAS, p. 48

3.5 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS, p. 48

3.5.1 **Enumeração de coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*)**, p. 49

3.5.1.1 Preparo das diluições, p. 49

- 3.5.1.2 Teste presuntivo, p. 49
- 3.5.1.3 Teste confirmativo, p. 50
- 3.5.1.4 Teste completo, p. 50
- 3.5.1.5 Provas bioquímicas do IMViC, p. 51
- 3.5.2 **Isolamento e identificação de *Salmonella* spp**, p. 52
 - 3.5.2.1 Pré-enriquecimento, p. 53
 - 3.5.2.2 Enriquecimento seletivo, p. 53
 - 3.5.2.3 Plaqueamento seletivo diferencial, p. 53
 - 3.5.2.4 Confirmação preliminar, p. 54
 - 3.5.2.5 Confirmação definitiva (provas bioquímicas e sorológicas), p. 55
- 3.5.3 **Enumeração de coliformes termotolerantes *Escherichia coli***, p. 60
- 3.5.4 **Isolamento e identificação de *Salmonella* spp**, p. 61
- 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS, p. 63

- 4 RESULTADOS**, p. 64
- 5 DISCUSSÃO**, p. 72

- 6 CONCLUSÕES**, p. 79

- 7 SUGESTÕES**, p. 81

- 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**, p. 82

- 9 OBRAS CONSULTADAS**, p. 91

- 10 ANEXOS**, p. 92

- 11 APÊNDICE**, p. 94

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1: Temperatura média de recepção da carne bovina no comércio varejista dos estabelecimentos pesquisados, p. 67
- Fig. 2: Proporção das amostras de carne bovina do estabelecimento A com temperatura acima do permitido pela legislação vigente, p. 67
- Fig. 3: Proporção das amostras de carne bovina do estabelecimento B com temperatura acima da permitida pela legislação vigente, p. 68
- Fig. 4: Amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) que demonstraram aumento do valor o NMP após a desossa, p. 68
- Fig. 5: Percentual total de amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* antes e depois da desossa, p. 69
- Fig. 6: Percentual total de amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* analisadas, obtidas nos estabelecimentos varejistas A e B, p. 69
- Fig. 7: Percentual de amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* antes da desossa nos estabelecimentos varejistas A e B, p. 70
- Fig.8: Percentual de amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* depois da desossa nos estabelecimentos varejistas A e B, p. 70
- Fig. 9: Amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* antes e depois da desossa nos estabelecimentos varejistas A e B individualmente, p. 71

Fig. 10: Parâmetros bacteriológico e físico-químico das amostras de carne bovina analisadas, obtidas nos estabelecimentos comerciais pesquisados, enquadrados dentro e fora dos padrões mencionados, p. 71

Foto 01 - Transporte da meia carcaça bovina com auxílio do “lombador”, p. 96

Foto 02 - Acondicionamento das meias carcaças no interior do caminhão, p. 96

Foto 03 - Local inadequado para higienização das mãos, dos equipamentos e utensílios, no estabelecimento A, p. 97

Foto 04 - Local impróprio para o armazenamento de facas, no estabelecimento A, p. 97

Foto 05 - Transporte da meia carcaça bovina do caminhão até a sala de desossa, no estabelecimento A, p. 98

Foto 06 - Transporte da meia carcaça bovina do caminhão até a sala de desossa, no estabelecimento B, p. 98

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A ^o	Angstrom
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIDS	“Acquired Immune Deficiency Syndrome”
APHA	“American Public Health Association”
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BHI	“Brain Heart Infusion”
BPF	Boas Práticas de Fabricação
cm	centímetro
CDC	“Center for Disease Control”
DBMD	“Division of Bacterial and Mycotic Diseases”
DTA	Doença Transmitida por Alimento
EaggEC	“Enteraggregative <i>Escherichia coli</i> ”
EHEC	“Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> ”
EIEC	“Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> ”
EPEC	“Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> ”
ETA	Enfermidade Transmitida por Alimento
ETEC	“Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> ”
EUA	Estados Unidos da América
FDA	“Food and Drug Administration”
FEEC	“Facultative enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> ”
FSIS	“Food Safety and Inspection service”
g	grama
h	hora
hab	habitante
HACCP	“Hazard Analysis and Critical Control Points”
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICMSF	“International Commission on Microbiological Specification for Foods”
Kg	Kilograma
KOH	Hidróxido de potássio
LIA	“Lisina Iron Agar”
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	miligrama
MR-VP	“Metil Red- Voges Proskauer”
NMP	Número Mais Provável
n ^o	número
pH	Potencial Hidrogênio iônico
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de origem Animal

SECOM/MT	Secretaria do Comércio de Mato Grosso
SIM	Sulfêto Indol Motilidade
SUH	Síndrome Urêmica Hemolítica
TSI	“Triple Sugar Iron”
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFMT	Universidade Federal de Mato-Grosso
USDA	“United States Department of Agriculture”
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges Proskauer
° C	Grau Celsius
%	Por Cento

RESUMO

Considerando-se que a literatura especializada pouco relata sobre a transferência da prática de desossa dos frigoríficos para as casas atacadistas (açougues, supermercados, casas de carne, etc) o presente trabalho teve como objetivo estimar se a prática de desossa da carne bovina em casas atacadistas influencia na qualidade bacteriológica do produto final, bem como, verificar se existe diferença com relação a qualidade bacteriológica da carne bovina recebida e desossada em estabelecimentos comerciais localizados em áreas distintas, área periférica (A) e área central (B), do município de Cuiabá/MT, Brasil. As análises envolvidas neste estudo foram NMP (número mais provável) de coliformes termotolerantes com enumeração de *Escherichia coli* e isolamento e identificação de *Salmonella* spp, correlacionadas com valores de pH e temperatura da carne. As amostras analisadas corresponderam ao corte de alcatra (*Tensor fasciae latae*), sendo 40 amostras para cada estabelecimento, perfazendo um total de 80 amostras. Comparando-se, separadamente, os resultados obtidos antes e após o processo de desossa nos referidos estabelecimentos, quanto ao NMP de coliformes termotolerantes, constatou-se que o processo de desossa realizado em casas atacadistas, não influencia negativamente na qualidade bacteriológica do produto final, apesar de 35% das amostras no estabelecimento A e 17,5% das amostras no estabelecimento B ter apresentado aumento no valor do NMP após o processo de desossa. Houve diferença estatística significativa com relação ao padrão de qualidade bacteriológica entre os estabelecimentos analisados, no que se refere ao isolamento e identificação de *Salmonella* para o estabelecimento (A) localizado na periferia da cidade.

Palavras-chave: Desossa, Alcatra, *Salmonella* spp e *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Very few is reported about the deboning process being transference from slaughterhouses to wholesale houses (butchers, supermarket, meat's house and so on) by specialized literature. This work's objective is to evaluate if this transference has been influencing in the bacteriological quality of the final product, also to verify the difference among deboned-meat in commercial establishments of distinct areas, peripheric area (A) and central area (B), of Cuiabá district - MT, Brazil. NMP analysis (more probable number) of termotolerants coliforms and enumeration of *Escherichia coli* were done. Isolation and identification of *Salmonella* spp. analysis were correlated with pH and temperature values of the meat. Samples analyzed come from rump area (*Tensor fasciae latae*), being 40 samples for each establishment, and a total of 80 ones. Results were evaluated before and after of the deboning process in the those establishments related to NMP of termotolerants coliforms. This process in wholesale houses, has no negative influence on the bacteriological quality of the final product. Although 35% of the samples in the establishment (A) and 17.5% in establishment B showed up high value for NMP after the deboning process. It had significant statistics difference related to the bacteriological quality standard among the studied areas, and isolation and identification of *Salmonella* for peripheric area (A).

Key-words: Deboning process; rump; *Salmonella* spp.; *Escherichia coli*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil conta com o maior rebanho comercial bovino do mundo, com população estimada de 178.016.652, ultrapassando a Austrália e os EUA, garantindo o “status” de maior exportador de carne bovina do mundo (IBGE, 2002). O maior rebanho bovino do Brasil se encontra na região Centro-Oeste, onde a atividade da pecuária é favorecida tanto pelo relevo, com extensas áreas planas, quanto pela vegetação, com predominância em campos, sendo o estado do Mato-Grosso o maior criador e produtor do rebanho bovino nacional, com 24 milhões de cabeças (SECOM/MT, 2004).

Os produtos de origem animal, em especial a carne bovina, são alimentos amplamente consumidos, sendo o consumo interno *per capita* da carne bovina no Brasil de 36,2 Kg/hab./ano (IBGE, 2002). Contudo, uma maior expansão neste segmento de mercado tem sido dificultada pela redução da vida útil decorrente de alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas deste produto (BORGES e FREITAS, 2002). Dessa forma, a carne bovina consumida é considerada de baixa qualidade, conseqüência de uma série de fatores que ocorrem desde a produção até a comercialização no mercado varejista.

Devido o seu elevado valor biológico, a carne serve de substrato para a multiplicação de inúmeros microrganismos, sendo muitos os fatores que podem favorecer a multiplicação microbiana, tais como as diversas operações que a carne sofre antes da sua comercialização, que podem comprometer a qualidade do produto final. Caso essas operações não sejam realizadas dentro dos padrões higiênico-sanitários, pode, transformar-se em fontes de veiculação de microrganismos.

A carne está exposta às contaminações em todas as fases do seu processamento tecnológico, particularmente nas operações em que é mais manipulada e sempre que não são tomados cuidados especiais com o condicionamento da atmosfera em volta dela (PARDI et al., 2001).

Segundo James, 1996 a carne é submetida a condições impróprias em todas as etapas da cadeia produtiva, ressaltando ao nível de distribuição e comercialização no qual, vários elos frágeis da cadeia do frio industrial são freqüentemente rompidos.

Outra etapa realizada antes da comercialização e de extrema importância, é a desossa, prática relativamente comum às grandes redes de supermercados. Esta etapa pode tornar-se fonte de veiculação de doença transmitida por alimento enfermidade transmitida por alimento (ETA) principalmente quando não são tomados cuidados higiênico-sanitários adequados.

Muitos são os microrganismos que podem ser encontrados na carne bovina como a *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Pseudomonas* spp, *Achoromobacter* spp, entre outros (NORTJÉ e NAUDÉ, 1981; PARDI et al., 2001).

Um dos objetivos do presente trabalho é a avaliação bacteriológica da carne bovina recebida ao nível de mercado retalhista, bem como a influencia do processo de desossa da mesma no mercado varejista do município de Cuiabá – MT. Com a finalidade de se verificar se o processo de desossa da carne bovina em estabelecimentos comerciais influencia na qualidade bacteriológica do produto final. Para tal serão utilizados como parâmetros a enumeração de coliformes termotolerantes (*E. coli*) e o isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

Procurou-se neste trabalho promover a comparação entre a qualidade bacteriológica e parâmetros físico-químicos (pH e temperatura) da carne bovina recebida e posteriormente desossada em dois estabelecimentos comerciais, localizados em áreas distintas (geograficamente e/ou economicamente) do referido município.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A carne constitui um alimento nobre para o homem, devido seu fornecimento de energia, sua função plástica na formação de novos tecidos orgânicos e a regulação de processos fisiológicos (PARDI et al., 2001).

A proteína é o componente mais importante da carne, não só pela quantidade, mas devido o seu elevado valor nutritivo. Alguns dos aminoácidos que formam as proteínas da carne são essenciais na dieta, por serem fornecidos pelo alimento, mas não são sintetizados pelo organismo. Essa habilidade de fornecer aminoácidos essenciais em elevadas percentagens, faz da carne um alimento de elevado valor biológico (BRESSAN et al., 1999).

Um dos principais constituintes da carne, segundo Valle, 2000, é a gordura, que contribui na dieta humana como uma fonte de energia altamente concentrada, através dos ácidos graxos saturados e insaturados. Os ácidos graxos insaturados como o oléico, linoléico e araquidônico são essenciais para a saúde das crianças. Enquanto o corpo pode produzir ácido oléico a partir de precursores saturados, ele não pode produzir os demais ácidos graxos essenciais, a não ser que um deles seja fornecido pela dieta.

Quando cozida, a carne magra é facilmente digerida e fornece nutrientes que contribuem significativamente para um equilíbrio dietético das refeições, visto que cada 100 g de carne magra cozida fornece 50% das proteínas, 35% de ferro (Fe^{+++}), 25 a 60% de vitaminas do complexo B e 10% das calorias recomendadas ao dia (BRESSAN et al., 1999). A ingestão diária de carne bovina é importante, uma vez que uma pequena quantidade da mesma fornece boas quantidades de cada nutriente exigido diariamente.

No Brasil, a carne ocupa lugar de destaque na dieta da população, afigurando-se como um produto que faz parte da mesa do consumidor, embora apresentando variações, em decorrência da crise financeira por que vem passando o País (BRASIL, 1990). Bressan et al., 1999, afirmam que o consumo *per capita* de carne bovina no Brasil e em outros países em desenvolvimento está associado á fatores culturais e ao preço do produto. Pardi et al., 2001 caracterizam o nível de consumo de proteína de origem animal, em especial as da carne, como elemento indicativo de desenvolvimento sócio-econômico de um povo.

Entre os países que mais consomem carne no mundo, com cifras acima de 90 Kg/hab./ano estão os EUA, a Dinamarca, Canadá e Hong Kong. Com Valores de consumo entre 70 a 90 Kg/hab./ano estão a Argentina, Holanda, Austrália, França e Alemanha. Consumindo totais abaixo de 70/Kg/hab./ano estão o Brasil, Reino Unido, Japão, China e Arábia Saudita (BRESSAN e PEREZ, 2001).

A carne bovina quando adequadamente processada a partir de matéria-prima de boa qualidade, obtida sob condições higiênico-sanitárias satisfatórias, armazenada e transportada convenientemente, é seguramente uma fonte de saúde imprescindível ao ser humano. Porém, quando os padrões sanitários de qualidade não são observados, esta, torna-se veículo de enfermidades, não só pela presença de metais pesados, parasitos, vírus, metabólitos toxigênicos de fungos, mas também devido à presença de bactérias patogênicas e/ou suas biotoxinas, causando graves quadros de toxinfecções alimentares (EIROA, 1989).

2.1 FATORES QUE INFLUENCIAM O ESTADO DE CONSERVAÇÃO DA CARNE BOVINA

Sendo a carne uma das fontes básicas de proteína animal, devido o seu elevado valor biológico, torna-se extremamente susceptível ao processo de deterioração, necessitando da aplicação de procedimentos de conservação e armazenamento imediatamente após o abate. Inúmeros procedimentos e técnicas são usados para conservação dos produtos cárneos tais como a aplicação do frio industrial, aplicação do calor, o processo de desidratação, emprego da energia ionizante, aplicação de atmosferas modificadas, aplicação de substâncias químicas, alta pressão hidrostática, entre outras (SCHULZE, 2003). Todas apresentam

benefícios e limitações. Iremos deter-nos à aplicação do frio industrial, como fator coadjuvante na obtenção do aumento da vida útil dos produtos cárneos.

Segundo Pardi et al., 2001 a frigorificação ou tratamento pelo frio artificial ou industrial, constitui a técnica mais generalizada de conservação de carnes, quer preservando-as como recurso estacional, quer garantindo seu transporte à distância ou possibilitando seu uso ulterior na industrialização ou consumo. James, 1996, considera o processo de refrigeração como o processo mais importante no controle da multiplicação de microrganismos patogênicos no alimento.

Para que a aplicação do frio seja eficiente, faz-se necessário que o produto, a ser aplicado o frio, esteja em bom estado de conservação e este procedimento seja rápido e contínuo (ROSSET, 1994).

Lima, 1998 constatou que muitos elos do ciclo do frio da carne bovina são freqüentemente rompidos, provocando a perda da qualidade e salubridade de tal produto, ao acompanhar a comercialização da carne bovina no Estado do Ceará e a vigência da Portaria 304/96 (BRASIL, 1996). Tal autor estabelece ainda que em uma parcela da carne bovina comercializada no referido Estado, não se aplicava o frio industrial logo após o abate, devido a incapacidade numérica de câmaras frias dentro dos frigoríficos. Observou-se também a não continuidade do frio ao longo do transporte e distribuição até o mercado varejista. Possivelmente, a carne bovina que chega ao mercado varejista obtida desta forma, torna-se um alimento potencialmente capaz de causar ETA. Roça, 2000, enfatiza a necessidade de manutenção, da carne fresca, em temperaturas de refrigeração, que começa com o resfriamento da carcaça logo após o abate e continua no transporte, manipulação e exposição de cortes a venda e no armazenamento destes cortes na geladeira do consumidor.

Rosset, 1994, bem como Bresssan e Perez, 2001, dão ênfase a necessidade de manutenção da cadeia do frio em todas as etapas da cadeia produtiva da carne, assegurando a salubridade da mesma, visto que em temperaturas abaixo de 3°C reduzem drasticamente os riscos de multiplicação de bactérias patogênicas, responsáveis por ETA.

Os perigos para à saúde pública devido a microbiota patogênica da carne bovina podem ser minimizados, caso os processos de refrigeração e temperatura de estocagem sejam aplicados e mantidos adequadamente (GILL, 1996b).

Ainda com relação a microbiota da carne bovina, Panting, 1998, assinala que é preciso considerar que alguns microrganismos potencialmente capazes de causar ETA podem multiplicar-se a temperaturas superiores a 3°C e que na prática geralmente, a carne não é submetida a uma adequada refrigeração durante sua distribuição. Neves Filho, 2001, ressalta que independentemente do ponto da cadeia do frio onde ocorreu uma elevação de temperatura, ter-se-á uma alteração indesejável na qualidade cumulativa, sem recuperação da carne, mesmo que se reduza a temperatura em níveis ainda mais baixos.

Segundo James, 1996, deve-se ter atenção especial a todos aspectos da cadeia do frio, começando com a refrigeração inicial das carcaças, sendo esta etapa considerada de significativa importância na perda de peso, prazo de vida comercial e qualidade da carne. Afirma ainda que um dos pontos frágeis da cadeia do frio é o local de entrega, onde a carne é transferida para os retalhistas, devido às inúmeras oscilações de temperatura a que a carne é submetida além da temperatura de exposição nos locais varejistas ser freqüentemente elevada, acima de 10° C.

Segundo Gill, 1996b, o caminhão que realiza o transporte da carne bovina até o mercado varejista dever ser refrigerado, com a temperatura interna na faixa de 2°C a 4°C para que o produto, em nenhum momento durante o transporte, atinja a temperatura superior a 7°C.

De acordo com o fluxograma para produção e processamento da carne bovina fresca (ICMSF, 1997), o resfriamento da meia carcaça e o transporte da mesma são considerados pontos críticos de controle eficiente e não absoluto, respectivamente. O mesmo fluxograma caracteriza a etapa de corte e desossa como etapa de menor contaminação.

A transferência da etapa de desossa dos frigoríficos para as casas retalhistas (açougues, entrepostos, supermercados), dá margem para o surgimento de uma etapa extremamente comprometedor para a qualidade microbiológica da carne bovina, o transporte da mesma. Esta etapa é considerada um ponto crítico de controle a ser monitorado (APPCC, 1997), devido as constantes oscilações de temperatura, umidade e atmosfera (quebra do ciclo do frio), assim como pelo surgimento da figura do "lombador", indivíduo que transporta a meia carcaça do caminhão até o interior do estabelecimento retalhista na suas costas (Foto 01).

O transporte de carne com osso, sob a forma de quartos, e a desossa dessas peças em açougues e supermercados parecem constituir inconvenientes de ordem

higiênico-sanitária e desperdício econômico. O manuseio inadequado e anti-higiênico dos quartos e de peças “nuas” até o mercado varejista desvirtua todos os cuidados dispensados ao produto ainda no matadouro ou nos entrepostos (BRASIL, 1990).

Nos últimos anos a desossa não ficou restrita apenas aos matadouros frigoríficos ou aos açougues, onde a carne era desossada sem qualquer fiscalização e com as mínimas condições de higiene dos estabelecimentos (PARDI et al., 2001). Atualmente, a desossa já se tornou uma prática relativamente comum às grandes redes de supermercado, onde as meias carcaças chegam em cortes como quarto traseiro e quarto dianteiro; e em salas apropriadas são desossadas. Por ser uma prática relativamente nova, ainda há pouca pesquisa verificando a influência da desossa na qualidade bacteriológica do produto final.

Com objetivo de regulamentar e manter o mesmo padrão de qualidade da carne bovina desossada em casas atacadistas, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou a Portaria 304/96 (BRASIL, 1996), posteriormente a 145/98 (BRASIL, 1998), implantando a obrigatoriedade aos estabelecimentos que visam realizar desossa em suas instalações, obter autorização junto ao MAPA, desde que apresente projeto para transformação em entreposto com desossa aprovada.

James, 1996 chama a atenção também para a temperatura de comercialização da carne bovina nos mercados varejistas. Este autor acrescenta ainda como outro elo frágil da cadeia do frio, a temperatura de exposição da carne bovina nos balcões frigoríficos, visto que em sua pesquisa oscilou entre 5°C a 20°C, resultando em temperatura do produto entre 6°C a 12°C. Segundo Nottingham, 1982, nos Estados Unidos da América os supermercados tem particular importância na deterioração da carne por ação microbiana, devido à falta adequada da cadeia do frio.

Os autores Veras, Blum e Silva, 2001 constataram em sua pesquisa, coletando amostras de carne bovina de supermercados e açougues localizados em bairros de baixo e alto poder econômico na cidade do Rio de Janeiro, que as amostras obtidas nos estabelecimentos localizados nos bairros de baixo poder econômico foram superiores aos padrões legais. Sobreiro et al, 2003 em sua pesquisa verificando a relação entre a qualidade dos produtos de origem animal comercializados no mercado varejista e o nível sócio-econômico do consumidor,

verificaram que a temperatura das amostras de produtos de origem animal comercializados nos açougues de nível sócio-econômico inferior apresentaram temperaturas superiores às amostras obtidas nos bairros de nível sócio-econômico superior, porém os resultados foram contrários nas amostras obtidas em supermercados.

De acordo com Forrest et al., 1979, a velocidade de resfriamento e a temperatura de armazenamento da carne, bem como o pH final da mesma, são os fatores que mais influenciam sobre o prazo de vida comercial da carne bovina.

O pH é considerado um importante determinante do crescimento microbiano, sendo a acidificação da carne bovina uma excelente barreira ao processo de deterioração (LAWRIE, 1979).

Segundo Bartels et al., 1971, o pH expressa a concentração de íons hidrogênio livres no músculo. A capacidade de conservação da carne depende do curso da acidificação após o sacrifício do animal. A determinação do pH é indicada para ter uma idéia do estado de conservação da carne fresca.

Thornton, 1969 bem como, Forrest et al., 1979, afirmam que a queda do pH muscular, em consequência do acúmulo de ácido láctico é produzida a partir do glicogênio durante a glicólise anaeróbica. Lawrie, 1979, considera este comportamento bioquímico como um dos fenômenos pós- mortais mais significativos que acontecem no músculo durante sua conversão em carne. Os autores supra citados citam que em bovinos recém abatidos, o pH da carne é aproximadamente 7,0 caindo para 5,6 – 5,7 após seis a oito horas do abate, alcançando o pH final de 5,3 a 5,7 aproximadamente 24 horas após o abate.

A queda de pH e da temperatura durante o processo de *rigor mortis* das carcaças dos animais de açougue influenciam diretamente na qualidade da carne (SWATLAND, 1984).

O grau de atividade muscular anterior ao sacrifício influencia a quantidade de glicogênio muscular armazenado no momento do sacrifício. Em animais exaustos, o glicogênio pode estar quase totalmente esgotado de forma que a glicólise *post mortem* e os valores finais do pH são altos em relação a carne obtida de animais que não foram submetidos a situações de “stress” (ibid).

Segundo o Laboratório Nacional de Referência Animal - LANARA (BRASIL, 1981) considera-se como carne apta para consumo, aquela com valor de pH entre 5,8 a 6,2 e para consumo imediato a carne que apresente pH até 6,4 e valores

acima deste último, em estágio inicial de decomposição. Silva, 1988, estabelece uma faixa de pH de 5,6 a 6,0 para carne considerada boa para o consumo e as que apresentam-se na faixa de 6,0 a 6,4, apesar de serem ainda consideradas em condições de consumo, o autor sugere a aplicação de outras provas antes de sua liberação ao consumo.

Com base no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitário de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (BRASIL, 1997) no seu artigo 847, estabelece os valores de pH entre 6,0 e 6,4, sem prejuízo da apreciação dos caracteres sensoriais, para carne ainda em condições de consumo.

Falhas durante a obtenção da carne bovina (pH elevado devido a exaustão do glicogênio muscular durante as operações de pré abate, aplicação inadequada ou insuficiente do frio imediatamente após o abate e nos demais elos da cadeia), resultam em perda da qualidade e redução do prazo comercial deste produto.

Os alimentos são freqüentemente utilizados como substrato para o desenvolvimento de várias espécies de microrganismos. A pesquisa de bactérias patogênicas e/ou indicadoras de condições higiênico-sanitárias auxiliam na verificação da qualidade do alimento consumido (Lírio et al., 1998).

Dentre os microrganismos que são normalmente utilizados como “índices de qualidade e segurança do alimento”, a legislação brasileira, Resolução RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001) exige para carnes *in natura* apenas a ausência de *Salmonella* spp. Contudo, no presente trabalho optou-se pela determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes, com enumeração direta de *Escherichia coli*, como indicativo de contaminação fecal, além do isolamento e identificação de *Salmonella* spp prevista pela legislação vigente.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a salmonelose figura como uma das mais importantes enfermidades transmitidas por alimentos, seja pelo número de pessoas afetadas, complicações e seqüelas da doença, quantidade e volume de produtos alimentícios contaminados, seja pela perda econômica com tratamento médico/hospitalar ou reprocessamento/distribuição de alimentos (KAKU et al., 1995).

Como microrganismo indicador, a presença de *Escherichia coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros microrganismos enteropatogênicos (FRANCO, 2002).

2.2 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CONSUMO DE PRODUTOS CÁRNEOS

As suas qualidades nutricionais, o elevado conteúdo hídrico e o pH elevado, próximo à neutralidade, fazem da carne bovina um meio de cultura ideal para numerosos microrganismos (CARVALHO, 2001; BORGES e FREITAS, 2002).

De acordo com Leitão, 2003, ao longo do processamento industrial, inúmeros fatores contribuem, em maior ou menor intensidade para o aumento e diversificação dessa microbiota contaminante. O mesmo autor considera que a carga microbiana do produto final, independente de sua natureza, é resultante do somatório de fatores atuantes nas inúmeras etapas do processo, os quais poderiam ser sintetizados em: condições de criação, adequidade do transporte dos animais, condições de manutenção pré-abate, sangria, esfolagem e evisceração, lavagem das carcaças, refrigeração, transporte das carcaças, corte e embalagem do produto final.

Devido a sua capacidade como substrato para os microrganismos e ao número elevado de operações inerentes ao processamento industrial e também da intensidade do manuseio ao longo do processo, as carnes normalmente apresentam números elevados de contaminantes microbianos, potencialmente patogênicos ou não (FLISS, SIMARD e ETTRIKI, 1991b).

Gill e Newton, 1982, verificaram que a maior parte da microbiota da carne *in natura* encontra-se na superfície da carcaça. Para, Nottingham, 1982, bem como, Dickson e Anderson, 1992, o tecido muscular bovino, logo depois do abate, é praticamente estéril. Dainty e Mackey, 1992, afirmam que a contaminação da carne ocorre, inevitavelmente, durante os processos que conduzem à sua obtenção.

Os autores, Tompkin; McNamara e Acuff, 2001, relatam que a microbiota superficial de carcaças recém abatidas encontra-se entre 10^2 a 10^3 bactéria/cm², sendo encontradas preferencialmente, bactérias mesófilas, originárias do trato gastrointestinal e da superfície externa (pele) dos animais.

Segundo Fliss, Simard e Ettriki, 1991b, muitas enfermidades de origem alimentar são atribuídas ao consumo de carne contaminada por microrganismos patogênicos. A microbiota da carne crua é muito heterogênea, originária do próprio animal, solo, água, manipuladores e equipamentos durante o processamento.

Em linhas gerais, a microbiota da carne é constituída por bactérias psicotróficas Gram negativas, não fermentativas, dos gêneros *Pseudomonas*,

Moraxella e *Acinetobacter*, ao lado das bactérias Gram negativas fermentativas da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Aeromonas*. Já no grupo das bactérias Gram positivas, destacam-se principalmente *Lactobacillus* sp e *Brochothrix thermosphacta* (PARDI et al., 2001).

Ao lado das bactérias, deve-se destacar também a presença de bolores, dos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Rhizopus*, etc., e de leveduras, principalmente dos gêneros *Cândida* e *Rhodotorula* (ICMSF, 1980).

Com relação à presença de microbiota patogênica na carne, pode-se destacar principalmente *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* (ibid).

Segundo Satin¹ (1999, apud SCHÜLLER, 2000), a toxinfecção alimentar é um termo geral que se aplica a todas as gastroenterites de origem alimentar, referindo-se à irritação e inflamação do trato digestivo. A gastroenterite é o resultado da ingestão de alimentos que contém cargas virulentas de microrganismos patogênicos ou de suas toxinas.

Várias são as divergências em relação à classificação das toxinfecções, segundo ainda o mesmo autor, são classificadas em três categorias: as infecções alimentares, as intoxicações e as tóxicoinfecções alimentares. A primeira refere-se aos casos em que a vítima ingere uma quantidade de microrganismos suficiente para sua multiplicação dentro do organismo, ou seja, uma dose infectiva. Como exemplo podemos citar a *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Campylobacter* spp. A segunda refere-se aos casos em que o paciente ingere as toxinas produzidas pelo microrganismo, tais como, por *Staphylococcus* spp ou *Clostridium botulinum*. As tóxicoinfecções são o resultado da interação das duas anteriores, isto é, o paciente ingere um alimento contendo uma dose infectiva de microrganismos patogênicos e uma vez a infecção instalada, estes começam a multiplicar-se rapidamente e a produzir toxinas. Exemplificada por *Clostridium perfringens*, a *Escherichia coli* e o *Vibrio cholerae*.

Neste mesmo contexto, Silva Jr., 2002, considera apenas dois quadros de gastroenterite, a intoxicação alimentar, que ocorre devido à ingestão de toxinas produzidas pelos microrganismos nos alimentos e a infecção alimentar, devido a

¹ SATIN, M. Food Alert! *The ultimate sourcebook for food safety*. New York: checkmark books; 1999.

multiplicação ou esporulação dos microrganismos no intestino, com utilização dos nutrientes na luz intestinal, em que ocorre agressão ao tecido epitelial, com ou sem produção de toxinas.

Devido a variedade e a extensão das enfermidades de origem alimentar, nenhum país é capaz de fornecer informações precisas sobre a incidência e prevalência de tais enfermidades, mesmo em países que possuem programas de supervisão dos casos, a maioria das informações são coletadas na ocorrência de pequenas notificações. Em países industrializados, os casos notificados provavelmente somam menos de 10% da real incidência, mas em países em desenvolvimento, a não notificação é muito maior, sendo estimado que menos de 1% dos casos de enfermidades de origem alimentar são notificados (MOTARJEMI et al., 1995).

Segundo uma estimativa feita pelo CDC, em 1993, nos Estados Unidos, as enfermidades alimentares acometem 6,5 milhões de pessoas e ocasionando 9.000 mortes anualmente. No Brasil, os dados relacionados à enfermidade alimentar são vagos e não refletem a real problemática dos poucos casos notificados. Em alguns Estados, como no Paraná, a Secretaria do Estado de Saúde e Bem Estar Social desenvolveu um programa de investigação epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos, desde 1982.

De acordo com Pardi et al., 2001, a carne e seus derivados constam entre os alimentos que mais preocupam a humanidade, em razão dos riscos que oferecem, riscos estes que, quando de natureza microbiana, decorrem não apenas de enfermidades transmissíveis ao homem pela ingestão de alimentos infectados, ou pelo simples contato com fontes de contaminação, mas também devem-se às toxinfecções alimentares e as micotoxicoses, bem como os vírus transmitidos pela carne.

Frente a essa problemática, Fortuna, 2002, ressalta que a não utilização das medidas higiênico-sanitárias poderá, conseqüentemente, levar uma contaminação em qualquer tipo de alimento, como os alimentos de origem animal, em especial a carne bovina, que é enquadrada como um alimento de alto risco epidemiológico.

2.3 TAXONOMIA, CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E COMPORTAMENTO FENOTÍPICO DA *Salmonella* spp

O gênero *Salmonella* spp pertence à família *Enterobacteriaceae* são bastonetes Gram negativos, oxidase negativos, anaeróbicos facultativos, apresentando metabolismo fermentativo e oxidativo dos carboidratos, sendo a maioria das cepas móveis devido aos flagelos peritríquios (LE MINOR, 1984; HOLT et al, 1994). Seu tamanho varia de 0,3 – 1 µm de comprimento (VARNAM e EVANS, 1996). As bactérias do gênero *Salmonella* são catalase positivos, indol e Voges-Proskauer negativos, vermelho de metila e citrato de Simmons positivos. Descarboxilam a lisina e ornitina, descarboxilam e dehidrolizam a arginina. Produz H₂S, não há hidrólise da uréia e a utilização do malonato é variável (LE MINOR, 1984; HOLT et al, 1994).

De maneira geral, as salmonelas crescem em faixa de temperatura de 5°C a 45°C, com temperatura ótima de 37°C. Crescem em pH na faixa de 4,5 a 9,0 valores abaixo do primeiro e acima do segundo são considerados bacteriostáticos para o microrganismo, sendo considerado pH ótimo para seu crescimento entre 6,5 e 7,5. Crescem em alimentos com até 0.93 de atividade de água (VARNAM e EVANS, 1991), porém desenvolvem-se melhor em valores de atividade de água de 0,94 a 0,99 (GLEDEL, 1994).

Resistem bem as temperaturas de refrigeração, no entanto, o congelamento provoca uma redução significativa, do número de germes, mas nunca a destruição completa (GLEDEL, 1994; SILVA, 2000).

A classificação da *Salmonella* é muito complexa e, apesar das inúmeras discussões, ao longo de vários anos, ainda não existe um consenso definitivo.

A classificação deste microrganismo mediante a análise antigênica, baseia-se no trabalho de Kauffmann e White, conhecido com “Esquema de Kauffmann e White” (JAY, 1994). Mediante este esquema, o gênero *Salmonella*, pode se diferenciar em sorotipos, em função das estruturas antigênicas de suas cepas. Distinguem-se em: Antígenos somáticos (antígeno O), antígenos de cobertura (antígenos capsulares – K) e os antígenos flagelares (antígenos H). Os antígenos somáticos são antígenos da parede bacteriana, de natureza lipopolissacarídica (LPS). São termoestáveis e álcoolácido resistentes. Os antígenos capsulares são os únicos que possuem o antígeno de virulência (Vi) que existe na *Salmonella typhi*, *paratyphi C* e *dublin*. Por

último, os antígenos flagelares, que são antígenos constituídos por uma única proteína, a flagelina, cuja composição em aminoácidos é constante para um tipo antigênico determinado (GLEDEL, 1994).

Com base na pesquisa de Le Minor, Veron e Popoff, 1982, novas propostas foram feitas acerca da nomenclatura e classificação das salmonelas, de acordo com os estudos referentes às características fenotípicas e genotípicas, principalmente da hibridação do ácido desoxirribonucleico (ADN). Tais investigações, indicaram que o ADN da *Salmonella cholerae suis*, *S. typhi* e *S. enteritidis* são estreitamente relacionados compreendendo, portanto, subespécies mais do que propriamente espécies. Os mesmos autores, propuseram que todas as bactérias do gênero *Salmonella*, pertencessem a uma única espécie, *Salmonella choleraesuis*, subdividida em seis subespécies: *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis* (subgênero I), *S. choleraesuis* subsp. *salamae* (subgênero II), *S. choleraesuis* subsp. *arizonae* (subgênero III monofásico), *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae* (subgênero III difásico), *S. choleraesuis* subsp. *houtenae* (subgênero IV) e *S. choleraesuis* subsp. *bongori* (*S. bongori* e estirpes relacionadas).

Com objetivo de melhorar a percepção da existência de uma só espécie, Le Minor e Popoff, 1987, em substituição a *Salmonella cholerae suis*, propuseram a designação *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (encontrada em animais de sangue quente), *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (isolada do ambiente, animais de sangue frio e algumas vezes também de animais de sangue quente), *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* e *diarizonae* (isolada de animais de sangue frio e aves; formalmente membros monofásicos e difásico, respectivamente), *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (isolada do ambiente e em animais de sangue frio), e *indica* (isolada de animais de sangue quente).

Segundo Popoff e Le Minor² (1997, apud LÁZARO, 1999) tomando-se ainda como exemplo a *Salmonella typhimurium* estabeleceu-se a designação *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar *typhimurium*. Desta forma, na prática clínica, os nomes da espécie e subespécies não necessitam ser indicados, sendo representado por *Salmonella* sorovar *typhimurium* ou simplesmente, *Salmonella typhimurium*.

² Popoff, M.Y.; Le Minor, L. Taxonomie du genre *Salmonella*. In: Formules antigeniques des serovars de *Salmonella*. WHO collaborating Centre for Reference on *Salmonella*. Instituto Pasteur - Paris, 7ème Révision. 1997. 4-7p.

2.4 IMPORTÂNCIA DA *Salmonella* spp EM SAÚDE PÚBLICA

As bactérias do gênero *Salmonella* spp são agentes freqüentes de surtos de Enfermidades Transmitidas por Alimentos. Por ser um microrganismo entérico, pode estar presente no intestino de animais de sangue quente e mais raramente, também nos de sangue frio (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Em função de sua capacidade de disseminação no meio ambiente, esta bactéria pode ser isolada de locais variados e diferentes (águas doces superficiais, costa marítima, carnes de animais, pescados, verduras, ovos, etc.) e conseqüentemente, de diversas matérias primas alimentares. Pode ainda ser veiculada pelo próprio homem, neste caso na condição de portador assintomático (JAKABI et al., 1999).

Silva, 2000, define a salmonelose como a infecção provocada pela ingestão de alimentos contaminados com um número significativo, de qualquer espécie de *Salmonella*.

As doenças causadas por *Salmonella* spp costumam ser subdivididas em três grupos: a febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*, as febres entéricas, causadas por *Salmonella paratyphi* (A, B e C) e as enterocolites (ou salmoneloses), causadas pelas demais salmonelas (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

Os sorotipos das salmonelas podem estar estritamente adaptados a um hospedeiro particular ou podem ser ubiqüitários. O homem é o único reservatório natural de *S. Typhi* e *S. paratyphi* A, B e C. Alguns sorotipos são adaptados a uma determinada espécie animal, como é o caso da *S. abortusovis* (carneiro) e a *S. gallinarum* (aves), enquanto que outros podem infectar indiferentemente o homem e uma grande variedade de animais, como é o caso da *S. typhimurim*, responsável por graves infecções de origem animal (BARRETO e VIEIRA, 2002).

Levantamentos realizados nos Estados Unidos, onde os surtos são notificados de forma mais sistematizada revelam que, no período de 1988 a 1992, ocorreram 549 episódios por *Salmonella* spp, representando 69% do total de notificações. Nos países da Europa, os dados existentes revelam situação semelhante à descrita para os Estados Unidos. Apesar da existência de sistema para notificação de doenças alimentares, nos países citados, assim como o Japão e Canadá, reconhece-se que os dados existentes não retratam a totalidade de surtos

por esta etiologia. No Brasil, onde tal sistema é incipiente, com exceção do Estado do Paraná, os relatos são ainda muito escassos (JAKABI et al., 1999).

De acordo com o FDA, 1996, a incidência de salmonelose demonstra crescimento tanto nos Estados Unidos como em países industrializados. Os casos reportados de salmonelose nos Estados Unidos, excluindo os casos de febre tifóide, nos anos de 1988 a 1995, demonstram esse aumento.

Segundo Barreto e Vieira, 2002 a cada ano surgem, aproximadamente 800.000 a quatro milhões de novos casos de *Salmonella* spp e resultam em 500 mortes nos Estados Unidos, sendo as crianças as que mais freqüentemente contraem a bactéria.

Silva, 2000, ressalta que devido a presença constante deste microrganismo no trato intestinal de animais de açougue, a sua incidência em carne é relativamente alta, sendo que a quantidade encontrada varia de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior contaminação das carcaças. A contaminação pode ocorrer ainda, nos postos de venda, em função de exposição e manuseio inadequados. Segundo Almeida, Gonçalves e Franco, 2002 a presença de salmonelas em tecidos musculares deve-se, muitas vezes, à práticas inadequadas de obtenção, processamento e comercialização da carne. Este patógeno representa um fator de risco á saúde pública, particularmente à população de baixa renda, que consome carnes provenientes de estabelecimentos com condições operacionais de grande precariedade.

Pela legislação brasileira, de acordo com a Resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001) que dispõe sobre as normas e padrões de controle microbiológico para produtos de origem animal, a presença deste germe bacteriano em 25 gramas do produto, torna o alimento impróprio para o consumo humano. Entretanto, existe uma quantidade necessária para a ocorrência da doença humana. A dose infectante pode variar em função do sorotipo e da afinidade dos mesmos a determinadas espécies animais, como por exemplo, menos de 10 células da *S. typhi*, exclusivamente humana, é suficiente para desencadear doença no homem, enquanto são necessárias 10^{11} / g da *Salmonella pullorum*, adaptada às aves, para causar a infecção do homem (JAY, 1994).

Apesar da *Salmonella* spp ser um microrganismo potencialmente capaz de causar infecções alimentares, o mesmo é facilmente destruído quando submetido a

temperaturas de 66,6°C/15 minutos (SILVA, 2000). Porém a grande preocupação com este germe é devido à possibilidade sempre presente de ocorrer contaminação cruzada, no preparo final de alimentos, principalmente de alimentos que são ingeridos sem tratamento térmico (KAKU et al., 1995). Apesar de ser considerada um microrganismo de ampla disseminação, e ser capaz de se difundir com facilidade pelos alimentos a partir de um produto contaminado (PERESI et al., 1998), as salmonelas são encontradas em pequenas quantidades nos alimentos, pois não são boas competidoras e por serem fortemente inibidas pela microbiota láctica, conforme relata Gledel, 1994, bem como pelas demais bactérias deteriorantes e/ou patogênicas (PINTO, 2000).

O isolamento de *Salmonella* em alimentos apresenta um problema para os bacteriologistas, pelo baixo número de microrganismos presentes, associado a microbiota bacteriana mista e mais numerosa. Técnicas de cultura convencionais para o isolamento a partir do alimento, envolvem etapas de pré-enriquecimento não seletivo, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo em meios indicadores seletivos, confirmação preliminar, provas bioquímicas e sorológicas (D'AOUST, 1984). Apesar de nos últimos anos muitos métodos com tecnologias avançadas terem surgido para diagnosticar *Salmonella* em alimentos, o método tradicional clássico, apesar de sua morosidade e labor, continua sendo amplamente utilizado em laboratórios de monitoramento de *Salmonella* nas indústrias de alimentos e sua eficiência representa confiabilidade nos resultados obtidos e a segurança nos programas de controle desta bactéria (GIOMBELLI e SILVA, 2001).

2.5 EPIDEMIOLOGIA DA *Salmonella* spp

As salmonelas são amplamente distribuídas na natureza, sendo o trato intestinal do homem e de animais o principal reservatório natural. A infecção do homem e dos animais é normalmente adquirida mediante ingestão de alimentos contaminados por fezes contendo salmonelas (PARDI et al., 2001). A simples presença de salmonela não é suficiente para causar a doença, sendo o número de células necessário, dependente da virulência do sorotipo envolvido. Fatores ligados ao hospedeiro como espécie, raça, idade, condições sanitárias, imunológicas e nutricionais, também influenciam (PINTO, 2000).

A distribuição geográfica dos diferentes sorotipos é variável, não sendo ainda bem definida. Contudo alguns sorotipos apresentam uma distribuição regional, como a verificada para a *S. derby* (México); *S. panama* (Europa); *S. weltewreden* (Ásia), *S. virchow* (Reino Unido e ex-União Soviética). Um dado epidemiológico importante sobre a *Salmonella* é o surgimento e subsequente desaparecimento de alguns sorotipos em determinadas localidades (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

O risco de se adquirir a infecção por *Salmonella* é obviamente maior onde os padrões de higiene são baixos e o clima é quente. As condições de alojamento também podem influenciar no aumento de exposição ao risco. A manutenção do nível de higiene em determinados locais pode ser difícil de ser controlada, como a de prisões, creches, acampamentos e hospitais (VARNAM e EVANS, 1996).

Hábitos alimentares podem influenciar consideravelmente a epidemiologia das salmonelas, como o hábito de ingestão de alimentos crus ou insuficientemente aquecidos (BARROS, PAVIA e PANETTA, 2002). Os alimentos à base de carne e ovos são os principais veículos da salmonelose humana, embora muitos outros alimentos possam ser contaminados secundariamente (LÍRIO et al., 1998).

Lázaro, 1999, ressalta, que de um modo geral a salmonelose é uma infecção de alta morbidade, porém de baixa mortalidade, resultando em perdas econômicas elevadas, devido à necessidade de cuidados médicos, hospitalizações e queda de produtividade do indivíduo acometido por esta enfermidade.

Jay, 1994, bem como, Silva, 2000, afirmam que o índice de mortalidade é relativamente baixo, em média 4,1% dos indivíduos envolvidos vão a óbito. A mortalidade está diretamente relacionada com a idade do indivíduo infectado; 5,8% no primeiro ano de vida, 2,0% entre 1 a 50 anos e 15% nas pessoas com mais de 50 anos.

Dados do FDA, 1996, porém afirmam que o grau de mortalidade da febre tifóide é de 10% comparado com menos de 1% com as demais salmoneloses. O grau de mortalidade da *S. Dublin* é de 15% quando associado à septicemia em idosos, já a *S. enteritidis* tem demonstrado aproximadamente, um grau de mortalidade em torno de 3,6%, em surtos ocasionados em hospitais e enfermarias, particularmente envolvendo idosos.

Segundo Campos³ (1999, apud BARRETO e VIEIRA, 2002) após a recuperação de uma infecção por *Salmonella* spp, alguns pacientes permanecem assintomáticos, podendo contribuir para a disseminação dessa bactéria, principalmente quando se trata de manipuladores de alimentos e, nesses casos, o diagnóstico deve ser monitorado por exames com coletas periódicas. Barros, Pavia e Panetta, 2002, relatam que o portador humano, manipulador em estabelecimentos de alimentação, vem sendo citado como o maior responsável por surtos de salmonelose.

Na fase aguda da enfermidade, o microrganismo pode ser isolado em material fecal. A presença do microrganismo nas fezes diminui gradualmente, com redução de mais ou menos 50% na segunda semana, cerca de 15% na quarta semana e raramente perdura por mais de seis a oito meses. Os que continuam excretando *Salmonella* são tidos como portadores (PARDI et al., 2001).

As bactérias restantes se localizam em certos locais dos intestinos, na vesícula biliar, no fígado e até nos rins, sendo excretadas continuamente. Esta eliminação permanente de microrganismos pode perdurar por semanas, meses e mesmo por anos. Além do homem, os animais passam a se comportar como importantes reservatórios de microrganismo (ibid). Jay, 1994, considera que 5% dos enfermos podem ser portadores do microrganismo depois de se curar da enfermidade.

Segundo Germano et al., 2000, considerando-se o manipulador de alimentos um veículo de contaminação em potencial, uma vez que o portador assintomático é difícil de ser detectado, a implementação e a manutenção do sistema de Análise de Perigos e Pontos críticos de Controle (APPCC) e de Boas Práticas de Fabricação (BPF), são ainda, a melhor forma de prevenção.

2.6 MECANISMO DE PATOGENICIDADE

Em se tratando de síndrome gastroentérica as bactérias do gênero *Salmonella* após ingeridas passam através da mucosa do estômago e iniciam o processo infeccioso na mucosa do intestino delgado e do colon. As salmonelas se multiplicam, aderindo-se às células epiteliais da região ileocecal, penetram nas

³ CAMPOS, L.C. *Salmonella* In: Microbiologia. 3º ed., São Paulo: Ed. Atheneu, cap.29, 1999, 586p.

células da mucosa, injuriando-as e migrando para a lâmina própria (TOLEDO, 1998). No caso das enterocolites, as salmonelas ficam restritas à lâmina própria e são fagocitadas pelos macrófagos e monócitos, resultando em resposta inflamatória, decorrente da hiperatividade do sistema retículoendotelial. Nestes casos, raramente se observa septicemia ou infecção sistêmica, ficando a infecção restrita à mucosa intestinal (PINTO, 2000; STROHL et al, 2004)).

A resposta inflamatória do hospedeiro se dá com a hipertrofia e hiperplasia dos folículos linfóides mediada por liberação de prostaglandinas que estimula a adenilciclase, produzindo ativa secreção de fluídos e resultando em diarreia aquosa (STROHL et al, 2004).

Nos quadros de febre tifóide e febre entérica, os sintomas são muito graves devido o desenvolvimento de septicemia, que serão relatados detalhadamente na seção 2.5. A infecção se inicia de maneira semelhante a infecção causada pelas enterocolites, com penetração da bactéria nas células epiteliais intestinais, invasão e multiplicação na lâmina própria, porém nas infecções sistêmicas, a bactéria é introduzida na corrente sanguínea por via linfática (TOLEDO, 1998). Os microrganismos são fagocitados por macrófagos, dentro dos quais multiplicam-se, causando posteriormente a destruição dos macrófagos com liberação de inúmeras bactérias na corrente circulatória, dessa forma podendo atingir diversos órgãos, como fígado, baço e vesícula biliar até estabelecer uma infecção sistêmica (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

2.7 QUADRO CLÍNICO

Em média o período de incubação é de 18 horas, após a ingestão do alimento contaminado ou, variando de três a 36 horas podendo chegar até 72 horas (HOBBS e ROBERTS, 1999).

A manifestação clínica é traduzida por cólicas abdominais, náuseas, vômitos, calafrios, febre, cefaléia e diarreia, muitas vezes sanguinolentas (GLEDEL, 1994). Normalmente esses sintomas são acompanhados de abatimento, debilidade muscular, cansaço, febre moderada e sonolência (SILVA, 2000). O quadro clínico pode persistir por um a dois dias e a recuperação dá-se, na maioria dos casos, após três dias do início da infecção. Estes prazos dependem da dose infectante ingerida,

do sorotipo envolvido e das condições do próprio hospedeiro (GERMANO e GERMANO, 2001).

As pessoas que desenvolvem o distúrbio gastrointestinal, normalmente se recuperam completamente, entretanto pode levar vários meses para que a microbiota intestinal esteja completamente normal. Um pequeno número de pessoas, que são infectadas pela *Salmonella* spp, desenvolverá dores nas articulações, irritações nos olhos e dor durante a micção, sendo este quadro chamado de Síndrome de Reiter. Tal quadro pode durar meses ou anos, podendo causar artrite crônica, que é difícil de ser tratada (DBMD, 2003).

No adulto algumas patologias pré-existentes, como a “acquired immune deficiency syndrome” (AIDS) e a esquistossomose, podem agravar a doença. Em crianças pequenas e recém-nascidas, a salmonelose pode ser bastante grave (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Pinto, 2000, também afirma que pacientes imunocomprometidos, principalmente com AIDS, apresentam 20 vezes mais bacteremia e gastroenterites por salmonelas, além das demais complicações mencionadas.

Os sintomas para as febres tifóides e febres entéricas são mais graves incluindo quadros de septicemia, febre alta, diarreia e vômitos, quando comparados com as enterocolites. Vale ressaltar porém que, a febre entérica, apesar de muito semelhante a febre tifóide, desenvolve sinais clínicos mais brandos que a última. Enquanto a febre tifóide pode perdurar por até oito semanas, as febres entéricas duram, no máximo, três semanas (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

2.8 MEDIDAS PREVENTIVAS

De acordo com Jay, 1994 devido a distribuição universal das salmonelas de origem alimentar, o controle fundamental desta doença será alcançado ao se eliminar os microrganismos de pessoas e de animais. Por ser um objetivo relativamente difícil de ser alcançado, podemos adotar medidas para prevenir a contaminação do alimento, além de medidas para prevenir a salmonelose.

No que se refere a adoção de medidas que previnem a contaminação da carne, deve-se atentar para as possibilidades de contaminação do animal, bem, como de contaminação cruzada. A primeira tem início, a partir do controle de

qualidade das rações fornecidas aos animais, pois uma vez contaminadas, infectam os animais ao consumi-las. Medidas de higiene devem ser aplicadas, também, a partir dos currais, onde, através das fezes e/ou bebedouros podem transmitir a enfermidade (PARDI et al., 2001). Cuidados especiais devem ser tomados na prática de evisceração dos bovinos, com aplicação eficiente das oclusões de reto e esôfago, evitando a ruptura dos mesmos (ibid).

Ao nível de consumidor, acredita-se que o portador de *Salmonella* desempenha um papel importante na transmissão das salmoneloses. A preparação e a manipulação inadequada dos alimentos nos estabelecimentos alimentícios seguem como as principais causas dos surtos (JAY, 1994). A rigor, com relação a eventuais portadores assintomáticos, deveria ser efetivamente exigido o exame periódico de fezes entre os manipuladores de produtos comestíveis. Para os portadores positivos, a medida recomendada o afastamento do manipulador até que o exame de seis coproculturas chegue a resultados negativos (PARDI et al., 2001).

Ainda, no que se refere ao controle da contaminação cruzada, medidas simples, porém eficientes devem ser adotadas como se segue: higienização das mãos e utensílios que entraram em contato com o alimento cru, evitando que entre em contato com o alimento que já sofreu tratamento térmico ou produtos que são ingeridos cru, como saladas. Outras medidas a serem aplicadas são a conveniente cocção, visto que este patógeno é destruído á temperatura de 66°C/ 15 minutos e manutenção em temperatura adequada; separar alimentos crus de cozidos; higiene corporal permanente e limpeza e desinfecção eficazes e controladas dos equipamentos, utensílios e ambiente (GLEDEL, 1994).

Outra medida consiste em impedir o desenvolvimento da bactéria mediante a aplicação eficiente e contínua do frio, visto que a maioria dos sorotipos de *Salmonella* não crescem em temperaturas inferiores a 7°C (GLEDEL, 1994; CARVALHO, 2001).

A implementação de Boas práticas de Fabricação (BPF) e dos princípios de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), são os instrumentos mais significativos para o controle das salmoneloses nas indústrias e estabelecimentos manipuladores de alimentos (BARROS, PAVIA e PANETA, 2002), bem como a educação sanitária de todas as pessoas envolvidas nos processos de produção e comercialização (DBMD, 2003).

2.9 TAXONOMIA, CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E COMPORTAMENTO FENOTÍPICO DA *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia*, pertence à família *Enterobacteriaceae*. Diferente da *Salmonella* e da *Shigella*, a maioria das cepas de *Escherichia* fermentam a lactose produzindo ácido e gás (VARNAM e EVANS, 1996). Ocorrem de forma simples ou aos pares e muitas cepas possuem cápsulas ou microcápsulas. Apresentam-se na forma de bastonetes Gram negativos, móveis devido seus flagelos peritríquios, sendo algumas cepas imóveis. São quimioorganotróficos, possuindo metabolismo fermentativo e oxidativo dos carboidratos. São oxidase negativos, catalase positivos, vermelho de metila positivo, Voges-Proskauer negativo e usualmente citrato negativo. Reduzem nitrato a nitrito, são negativas para presença de H₂S, uréia e lipase negativa (HOLT et al., 1994). Geneticamente, apresenta relação íntima com o gênero *Shigella*, embora sua atividade bioquímica seja mais intensa. As cepas de EIEC apresentam a patogenicidade semelhante a da *Shigella*, porém, não existe evidência de produção de toxina “Shiga” ou de qualquer outro tipo de toxina, pela EIEC. A virulência está inteiramente associada com a invasão celular e a resposta provocada no tecido infectado (ORSKOV, 1984; VARNAM e EVANS, 1996).

É um mesófilo típico capaz de se desenvolver entre 7°C e 46°C, sendo 37°C a temperatura ótima, embora existam cepas que possam se multiplicar a 4°C (GERMANO e GERMANO, 2001). São facilmente destruídos a 60°C por poucos segundos, mas resistem por vários meses em temperaturas de refrigeração.

A *E. coli* é considerada um competidor mais efetivo frente aos microrganismos contaminantes e a microbiota láctica, que a *Salmonella* (VARNAM e EVANS, 1996).

2.10 IMPORTÂNCIA DA *Escherichia coli* EM SAÚDE PÚBLICA

A *Escherichia coli*, espécie da família *Enterobacteriaceae*, faz parte da microbiota normal do trato intestinal dos homens e dos animais e sua presença na carne geralmente indica contaminação de origem fecal direta ou indireta (FLISS, SIMARD e ETTRIKI, 1991b). Apesar de ser uma bactéria que pode ser introduzida no alimento a partir de outras fontes não fecais, é o melhor indicador de

contaminação fecal conhecido até o presente (HAJDENWURCEL, 1998; KORNACKI e JOHNSON, 2001).

Apesar da *E. coli* ter sido considerada como um patógeno oportunista, o interesse das indústrias de alimentos sobre o microrganismo tem sido restrito nesta parte como um microrganismo indicador. Entretanto, nos últimos anos a *E. coli* tem sido reconhecida como um patógeno específico tanto de ambiente intestinal quanto extra-intestinal (VARNAM e EVANS, 1996). Algumas cepas de *E. coli*, desenvolveram a habilidade para causar distúrbio gastrointestinal, urinário e/ou ao sistema nervoso central, ao mais robusto dos hospedeiros humanos. Cepas diarréicas de *E. coli* podem ser divididas pelo menos em seis diferentes categorias, que correspondem a diferentes categorias patogênicas (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

Apesar do elevadíssimo número de tipos antigênicos, apenas uma minoria é capaz de provocar a doença no homem. São conhecidas cinco classes enteropatogênicas do patógeno, responsáveis por quadros de gastroenterites no homem como se segue: a enteropatogênica clássica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC) (VARNAM e EVANS, 1996; BUCHANAN e DOYLE, 1997), facultativamente enteroagregativa (FEEC) (FRANCO e LANDGRAF, 1996) e a enteroagregativa (EAaggEC), (VARNAM e EVANS, 1996; FRANCO e LANDGRAF, 1996; BUCHANAN e DOYLE, 1997; HOBBS e ROBERT, 1999).

Em sua pesquisa, Cerqueira, Tibana e Guth, 1997, em produtos à base de carne bovina crua, na cidade do Rio de Janeiro encontraram uma alta ocorrência de cepas produtoras de Shiga toxina nas cepas de *Escherichia coli* causadoras de síndromes diarréicas. Este estudo demonstrou que muitos sorotipos identificados, não haviam ainda sido relatados, no Brasil. Estes autores, ressaltam a importância deste achado, devido o risco à saúde pública que este achado representa.

2.11 EPIDEMIOLOGIA DA *Escherichia coli*

A *Escherichia coli*, faz parte da microbiota normal do trato intestinal do homem e de uma variedade de animais. Incluída na família *Enterobacteriaceae*, onde estão os mais importantes patógenos entéricos como a *Salmonella*, *Shigella* e

Yersinia. Apesar da maioria das cepas de *E. coli* não causar distúrbio gastrointestinal, certos grupos de *E. coli* podem levar a um quadro diarréico com várias seqüelas ou debilidade (MENG, FENG e DOYLE, 2001).

Com relação aos portadores humanos de *E. coli* é importante que uma distinção seja feita com relação as cepas não patogênicas, que estão presentes no trato intestinal da maioria da população, das cepas que são reconhecidamente patógenos entéricos (VARNAM e EVANS, 1996). Parece que em muitos casos, os portadores sofrem com a doença de forma assintomática. Adultos são relativamente resistentes á infecção por EPEC, alguns casos são reconhecidos, quando crianças são infectadas por adultos aparentemente saudáveis. Isso geralmente ocorre em famílias que as condições de alojamento são precárias, além da atenção especial que deve ser dada ás enfermarias. Existem alguns relatos de portadores assintomáticos de cepas de ETEC e EIEC.

As diarréias causadas pela *E. coli* apresentam distribuição mundial, contudo a real extensão da incidência não está dimensionada, principalmente devido a elevada subnotificação de casos (GERMANO e GERMANO, 2001).

Entre os agentes transmissores da *E. coli*, além da água para bebida, contam-se os mais variados alimentos, com importante papel reservado ao leite e seus derivados. A carne e seus derivados são também importantes veículos, bem como todos os alimentos excessivamente manipulados (PARDI et al., 2001).

Dentre as inúmeras cepas enterovirulentas do microrganismo, a que constitui maior preocupação para as autoridades de saúde, é a *E. coli* O157:H7 responsável pela forma enterohemorrágica da infecção, tendo sido identificada em 1982, associada com surtos de colite hemorrágica. A principal fonte de infecção é o consumo de produtos cárneos que não sofreram tratamento térmico adequado para eliminação da *E. coli* e o leite cru (ABOUT *E. coli*, 2003).

2.12 MECANISMO DE PATOGENICIDADE

O mecanismo de patogenicidade depende se o agente causal é pertencente ao grupo das linhagens invasoras ou das formadoras de enterotoxinas. No primeiro caso, dá-se uma infecção semelhante á disenteria, com multiplicação das bactérias no colon. As linhagens formadoras de enterotoxinas provocam sintomas

caracterizados por acessos de diarreia profunda, com acentuada desidratação do indivíduo (PARDI et al., 2001).

Em geral, a gastroenterite proporcionada pela *Escherichia coli* se caracteriza por diarreia sem sangue ou exudato inflamatório. As doses infectantes variam de acordo com o tipo de cepa considerada, com a idade do indivíduo exposto, bem como o seu estado imune (GERMANO e GERMANO, 2001). O período de incubação deste agente varia de cinco a 48 horas, com média ficando entre dez e 24 horas (PARDI et al., 2001).

A síndrome gastroentérica por EPEC é causada a partir da ingestão de 10^6 a 10^{10} células viáveis/g (JAY, 1994). As cepas de EPEC atacam as células da mucosa do intestino delgado, causando a destruição das microvilosidades e o desenvolvimento de lesões características. Ocorre diarreia líquida que raramente se torna crônica (STROHL, 2004).

As cepas de ETEC colonizam a mucosa do intestino delgado e por um processo mediado por enterotoxinas, as cepas de ETEC causam uma hipersecreção prolongada de íons cloreto e água pelas células da mucosa do intestino e inibem a reabsorção de sódio. O intestino fica repleto de fluídos, resultando em diarreia líquida que continua por vários dias. As enterotoxinas incluem uma toxina termoestável (ST) que causa uma elevação dos níveis celulares de guanilciclase, enquanto a toxina termolábil (LT) causa uma elevação da adenilciclase (OMS, 1999; STROHL, 2004). A dose infectante é alta, 10^6 a 10^8 células (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

As cepas EHEC ligam-se às células do intestino grosso, onde produzem uma exotoxina (verotoxina ou toxina do tipo Shiga), que causa uma forma grave de diarreia abundante e com sangue, a colite hemorrágica (Franco e Landgraf, 1996; OMS, 1999). Segundo Arthur et al., 2002 duas classes de Shiga toxina foram identificadas, a Shiga toxina 1 (Stx₁) e a Shiga toxina 2 (Stx₂). Ainda não se sabe ao certo a dose infectante necessária para manifestação da sintomatologia clínica, porém para Buchanan e Doyle, 1997 a dose infectante é relativamente baixa, na faixa de 2 a 2000 células.

As cepas de EIEC iniciam o processo de invasão com sua internalização pelo enterócito, devido a modificação do seu citoesqueleto tornando o processo mais eficiente. Após o processo de internalização a EIEC rompe a célula, multiplica-se e invade as células vizinhas, ocorrendo acúmulo de actina no local da divisão celular,

causando desarranjo da estrutura celular, determinando a morte celular (FRANCO e LANDGRAF, 1996). A dose infectante é semelhante a da ETEC (FRANCO e LANDGRAF, 1996; NATARO e KAPER, 1998).

2.13 QUADRO CLÍNICO

Os sinais clínicos das infecções causadas por *E. coli* dependem da cepa e sua patogenicidade e virulência, bem como da idade e do estado imune dos pacientes. O período de incubação varia de seis a nove dias dependendo da cepa e os sintomas da infecção são de simples casos de diarreia e cefaléia a casos mais graves como a síndrome urêmica hemolítica - SUH, (GERMANO e GERMANO, 2001).

As cepas de EPEC estão freqüentemente relacionadas as diarreias em recém nascidos e em jovens lactentes (FRANCO e LANDGRAF, 1996), sugere-se que podem causar distúrbios gastrointestinais também em adultos (PETRI; ANTUNES e SARIDAKIS, 1989). A diarreia provocada por EPEC é clinicamente mais grave que aquelas provocadas por outros patógenos. Geralmente o quadro clínico se caracteriza por diarreia acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre. A duração da doença varia de seis horas a três dias, com período de incubação variando de 17 a 72 horas (FRANCO e LANDGRAF, 1996).

As cepas de ETEC produzem enterotoxinas e são capazes de provocar a “diarreia dos viajantes”. O quadro clínico caracteriza-se por diarreia aquosa, normalmente acompanhada de febre baixa, dores abdominais e náuseas. Em forma mais severa, assemelha-se a cólera, com fezes aquosas “água de arroz” levando o indivíduo a desidratação. O período de incubação varia de oito a 44 horas (média de 26 horas). O quadro se agrava, quando os indivíduos acometidos estão desnutridos, a gastroenterite pode durar semanas, causando uma desidratação grave (ibid).

As cepas de EIEC são capazes de penetrar em células epiteliais e causar manifestações clínicas semelhantes às infecções por *Shigella*. A maioria das cepas de EIEC apresenta diversas características fenotípicas, que as tornam diferentes das demais cepas de *E. coli*, mas as tornam bastante semelhantes a *Shigella*, como a incapacidade de descarboxilar a lisina, a não fermentação ou fermentação tardia da glicose e a ausência de flagelos. A gastroenterite provocada por EIEC é bastante

semelhante àquela provocada pela *Shigella*. Características do quadro clínico são disenteria, cólicas abdominais, febre, mal estar geral, com eliminação de sangue e muco nas fezes. O período de incubação varia de oito a 24 horas com média de 11 horas (FRANCO e LANDGRAF, 1996; NATARO e KAPER, 1998).

A designação de EHEC é empregada para as cepas de *E. coli* pertencentes ao sorotipo O157:H7, que são implicadas como agente etiológico da colite hemorrágica, que se caracteriza clinicamente por dores abdominais severas e diarreia aguda, seguida de diarreia sanguinolenta. O quadro clínico desta, difere das demais cepas devido a grande quantidade de sangue nas fezes e a ausência de febre. O período de incubação varia de três a nove dias (média de quatro dias) (FRANCO e LANDGRAF, 1996). A enterocolite pode evoluir e causar a síndrome urêmica hemolítica – SUH (BUCHANAN e DOYLE, 1997; MENG, FENG e DOYLE, 2001; ARTHUR et al., 2002), que se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal (OMS, 1999).

Franco e Landgraf, 1996 mencionam a existência de uma linhagem denominada FEEC (*E. coli* facultativamente patogênica), aparentemente associada a surtos esporádicos de diarreia, no entanto, não foi ainda comprovada a existência de tal patógeno. Nenhuma notificação foi feita associando tal patógeno a surtos de origem alimentar (MENG, FENG e DOYLE, 2001).

A *Escherichia coli* enteroagregativa é uma linhagem patogênica recentemente descrita, sendo poucos os dados disponíveis a seu respeito, na literatura consultada (FRANCO e LANDGRAF, 1996). Os autores Meng, Feng e Doyle, 2001, atribuem as cepas de *E. coli* enteroagregativa quadros de diarreias persistentes, principalmente em crianças e vômito. O mecanismo de patogenicidade desta cepa é pouco conhecido, sendo descrita como cepa não produtora de enterotoxinas LT ou ST.

2.14 MEDIDAS PREVENTIVAS

A constatação de que um alimento está contaminado com *E. coli* é preocupante, considerando-se que se trata de um microrganismo de origem fecal e que apresenta linhagens patogênicas para o homem e animais (PETRI, ANTUNES e SARIDAKIS, 1989).

Cuidados especiais devem ser tomados com as águas de abastecimento, especialmente em locais onde a higiene é precária, visto que a *E. coli* é excretada em grande quantidade no ambiente, podendo dessa forma, contaminar as águas de abastecimento (VARNAM e EVANS, 1996).

Devem-se tomar cuidados também no uso adequado das técnicas de oclusões, no momento da evisceração dos animais abatido (PARDI et al., 2001). Segundo Dickson e Anderson, 1992 a principal fonte de *E. coli* em carcaças bovinas, em nível de abatedouros, seja devido a contaminação fecal durante a produção animal e nas operações de abate. Os mesmos autores enfatizam a necessidade do controle da contaminação fecal da carcaça durante a etapa de esfola, bem como a disseminação de tal contaminação para as demais carcaças através dos equipamentos e dos manipuladores. Desta forma, devem ser adotadas medidas eficazes de limpeza e desinfecção dos equipamentos, instalações e instrumentais utilizados.

É igualmente importante a cocção adequada dos alimentos cárneos, e o resfriamento rápido dos alimentos processados a temperaturas inferiores a 7°C (PARDI et al 2001). Segundo Archer, 2000, a cocção só é considerada um método seguro para a eliminação do patógeno do alimento, se monitorada. Vale ressaltar que a população não tem o costume de monitorar a temperatura de seu alimento durante a cocção, desta forma, tal autor, considera o emprego da irradiação da carne bovina como a medida mais efetiva e segura, garantindo a inocuidade do alimento.

Segundo Buchanan e Doyle, 1997 a aplicação dos princípios do Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP), continuam a ser o meio mais efetivo para o desenvolvimento sistemático da segurança alimentar, garantindo a redução do risco de infecções por cepas patogênicas de *E. coli*. Estes autores afirmam que um importante componente na aplicação do HACCP aplicado á produção animal, é a redução da disseminação da *E. coli* O 157:H7 dos animais. Duas medidas em potencial podem ser aplicadas, a exclusão competitiva e a vacinação.

2.15 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO BACTERIOLÓGICA NA CARNE

Existem vários procedimentos que são utilizados para determinar a microbiota da superfície da carne. Todos os métodos existentes, formam dois grandes grupos, os destrutivos e os não destrutivos (GILL e NEWTON, 1982). Nos métodos destrutivos, as amostras, padronizadas pelo peso e/ou tamanho, são cortadas e maceradas em um diluente esterilizado e em seguida convenientemente plaqueadas em ágar para a enumeração das colônias. Nos métodos não destrutivos, uma área padronizada é delimitada por um gabarito e em seguida os microorganismos são coletados por arraste, utilizando-se zaragatoa ou “swab” (ANDERSON et al., 1981; CHANDRAN et al., 1986; ANDERSON et al., 1987) ou esponjas (LASTA et al., 1992; DORSA; CUTTER e SIRAGUSA, 1996) que são agitados em um diluente esterilizado para a liberação dos microorganismos coletados. A suspensão resultante dessa operação é diluída e plaqueada, para enumeração dos contaminantes.

Os microbiologistas sugerem que a amostragem para a análise microbiológica da carne seja realizada em sua superfície, por ser uma área mais susceptível à contaminação durante o processo de abate do animal, inclusive da contaminação cruzada (SILVA e BERAQUET, 1998).

Fliss, Simard e Ettriki, 1991a, compararam a eficiência de três diferentes técnicas de amostragem para análise da superfície de carcaças: ágar contato direto, incisão do tecido e zaragatoa dupla. A incisão do tecido apresentou mais eficiência do que os outros métodos pesquisados. Mesmo assim, não foi recomendado pelos pesquisadores por se tratar de um método destrutivo. Nesta pesquisa, foi estabelecida a ordem de eficiência de primeiro a incisão de pele, seguido de zaragatoa e a de menor eficiência o ágar de contato.

Lasta et al., 1992 realizaram análises em amostras coletadas pela incisão do tecido e por zaragatoa. Os resultados obtidos mostraram que a incisão do tecido consegue coletar um número de microorganismos superior ao número coletado por zaragatoa. Fliss, Simard e Ettriki, 1991a, recomendaram o método de amostragem por zaragatoa para a coleta de microorganismos em carcaças inteiras, por oferecer a possibilidade da amostragem sem danificar a superfície externa da carcaça.

Uma pesquisa realizada por Anderson et al., 1987, verificou que não existe diferença estatística significativa em relação ao processo de incisão de pele

comparado ao de zaragatoa, exceto em carnes muito gordurosas. Este autor também observou que a técnica por zaragatoa recuperou percentuais similares de *E. coli* quando comparadas com a técnica por incisão de pele.

No presente trabalho adotou-se a técnica por zaragatoa (“swab”) por ser uma técnica de fácil aplicação (CHANDRAN et al., 1986), por não demonstrar diferença estatística significativa com relação ao nível de recuperação de células (ANDERSON et al., 1987) e por não danificar a superfície externa da carcaça (FLISS, SIMARD e ETTRIKI, 1991a).

Diante das considerações apresentadas, no que se refere a técnica não destrutiva empregada para coleta de amostra na superfície da carcaça, ressalta-se que embora a legislação brasileira vigente, fixe padrões microbiológicos da carne bovina *in natura* (em g ou mL), através da Resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001), optou-se trabalhar nesta pesquisa com amostragem por área, relacionando os resultados obtidos por cm², o que não invalida a avaliação e análise da presença dos patógenos utilizados, uma vez que a legislação americana “United States Department of Agriculture” – USDA (USDA, 1996), estabelece como padrão a amostragem por área (cm²) para superfície de carcaças bovinas e suínas.

Os EUA estabelecem como exigência aos países exportadores que se enquadrem em seu programa de redução de patógenos, estipulado pelo “Food Safety and Inspection Service” – FSIS- (FSIS, 1997) e a USDA, 1996, comprando apenas lotes, previamente testados e comprovadamente dentro dos padrões legais vigentes de seu programa, sendo: ausência de *Salmonella* e no limite máximo para *E. coli* de 10² por 10 cm² do alimento. De acordo com a FSIS, 1997 100% dos países exportadores de carne bovina para o EUA realizam testes de rotina para *Salmonella* e *E. coli*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente trabalho foi realizado no período compreendido entre julho a dezembro de 2003, junto a duas grandes redes de supermercados do município de Cuiabá – MT, sendo escolhido um estabelecimento localizado na área mais periférica da cidade, atendendo a população de baixo poder aquisitivo e outro na área central da cidade, que atende a população de alto poder aquisitivo, sendo codificados, como estabelecimento A e estabelecimento B, respectivamente.

Para as análises bacteriológicas empregadas nesta pesquisa, adotou-se a metodologia preconizada por Kornacki e Johnson, 2001, para enumeração de coliformes termotolerantes (*E. coli*) e a metodologia preconizada por Andrews et al., 2001 para isolamento e identificação de *Salmonella*, porém com adaptação, na etapa de pré-enriquecimento da última. Em conformidade com a metodologia preconizada Andrews et al., 2001, recomenda-se a utilização de caldo lactosado para pesquisa de *Salmonella* spp em produtos cárneos na etapa de pré-enriquecimento não seletivo, porém, de acordo com os autores Bailey, Cox e Blankenship, 1991, o caldo lactosado pode eventualmente ser inconveniente como pré-enriquecimento não seletivo quando aplicado a amostras que contém alta população de microrganismos fermentadores da lactose, pois a subsequente redução do pH do meio pode limitar a multiplicação de salmonelas, em particular das células injuriadas. Diante de tal consideração, o caldo lactosado utilizado na etapa de pré-enriquecimento não seletivo, foi substituído pela água peptonada tamponada 1%.

3.2 AMOSTRAGEM

Um total de 80 peças de alcatra (*Tensor fasciae latae*) foram avaliadas nesta pesquisa, sendo 40 peças analisadas no estabelecimento A e 40 peças analisadas no estabelecimento B.

Cada amostra foi obtida com o auxílio de um “swab” esterilizado friccionado de forma contínua no espaço delimitado por um molde de aço inoxidável previamente esterilizado, de 10 cm² de área de cada peça de alcatra. Foram utilizados dois moldes esterilizados para a obtenção de cada amostra, um antes da desossa e outro molde depois da desossa da referida peça, previamente identificada.

De cada peça de alcatra analisada retirou-se quatro “swabs”, os dois primeiros obtidos antes da desossa da peça, foram colocados individualmente, em um tubo de ensaio contendo 25 mL de solução salina peptonada 0,1% e o outro em um tubo de ensaio contendo 25 mL de água peptonada tamponada a 1%, para realização das análises de enumeração de coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*) e isolamento e identificação de *Salmonella* spp, respectivamente. A mesma técnica foi realizada para os outros dois “swabs” obtidos após a desossa. Como medida preventiva, para evitar a contaminação exógena os “swabs” foram cortados no interior do tubo de ensaio, retirando-se a extremidade que entrou em contato com os dedos. Cada amostra, em seu respectivo tubo de ensaio, contendo solução diluente (para enumeração de coliformes termotolerantes) e em água peptonada tamponada 1% (para isolamento e identificação de *Salmonella*), foi identificada, numerada e armazenada sob refrigeração (em caixa de material isotérmico com gelo) durante todo o processo de coleta e transportadas ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato-Grosso – UFMT, onde foram realizadas as análises bacteriológicas pertinentes.

3.3 TÉCNICA DE AFERIÇÃO DE TEMPERATURA DAS MEIAS CARÇAÇAS.

Para cada amostra coletada para análise microbiológica, aferiu-se a temperatura da meia carcaça e o pH da mesma. O primeiro procedimento realizado,

foi a determinação da temperatura do músculo, com auxílio de um termômetro digital “Checktemp”, introduziu-se a haste metálica do termômetro perpendicular à massa muscular (*Tensor fasciae latae*) na região do alcatra, até a profundidade de 2 cm. O valor verificado foi anotado em tabela, identificando o número da amostra (Quadro 2).

3.4 TÉCNICA DE AFERIÇÃO DO POTENCIAL HIDROGÊNIO-IÔNICO (pH) DA MEIA CARÇAÇA.

Amostras de aproximadamente 70g foram seccionadas do músculo *tensor fasciae latae*, identificadas e armazenadas em caixa isotérmica com gelo e transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato-Grosso.

A determinação do pH foi realizada pelo processo eletrométrico, com determinação do pH no filtrado, através de potenciômetro equipado com eletrodo conjugado (Schott), utilizando uma solução homogeneizada preparada com 50g de amostra com 10 mL de água destilada, conforme o LANARA (BRASIL, 1981).

Antes de cada tomada de medida de pH, o aparelho (potenciômetro) foi calibrado em soluções tampão pH 4,01 e 6,87, próprias para calibragem do eletrodo. A cada determinação o eletrodo foi lavado com água destilada e seco em papel toalha por compressão. O valor verificado foi anotado em tabela, identificando o número da amostra, juntamente com o valor observado na temperatura.

3.5 ANÁLISES BACTERIOLÓGICAS

Todos os materiais utilizados nas diferentes fases das análises bacteriológicas tais como pipetas, tubos de ensaio, becker, erlenmeyer, bastões de vidro e demais utensílios que eventualmente entraram em contato com a amostra, foram previamente submetidos à esterilização em autoclave por 121°C/ 15 minutos, tomando-se o cuidado de não operar com autoclave muito cheia, para facilitar a transmissão de calor. Outros cuidados foram tomados com relação ao processo de esterilização de vidraria vazia em autoclave como: a) a liberação imediata do vapor após o término do tempo de esterilização, através da válvula de descarga de vapor,

com o objetivo de reduzir o acúmulo de condensado e facilitar a secagem do material; b) posteriormente ao processo de autoclavação, todo material foi submetido à secagem em estufa.

Previamente ao início das análises diárias, realizava-se a descontaminação da superfície do fluxo laminar com álcool etílico 70%, seguido de 15 minutos de exposição de lâmpada ultravioleta com comprimento de onda na faixa de 900 a 3800 Angstrom (A°).

Os esquemas das metodologias bacteriológicas aplicadas são visualizados nas seções 3.5.3 e 3.5.4.

3.5.1 Enumeração de coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*)

3.5.1.1 Preparo das diluições

Para enumeração, confirmação e identificação de coliformes termotolerantes, adotou-se a técnica preconizada por Kornacki e Johnson, 2001, considerando o “swab” imerso em 25 mL de solução salina peptonada 0,1% como amostra. Após prévia homogeneização da amostra, a mesma foi vertida em erlenmeyer contendo 225 mL da mesma solução, sendo esta, considerada a diluição 10^{-1} . As demais diluições foram preparadas, retirando-se 01 mL da diluição 10^{-1} e vertendo em um tubo de ensaio contendo 09 mL da mesma solução, desta forma, obtendo-se a diluição 10^{-2} e para obtenção da última diluição (10^{-3}), retirou-se 01 mL da diluição 10^{-2} , vertendo tal alíquota em tubo de ensaio contendo 09 ml da referida solução.

3.5.1.2 Teste Presuntivo

Após o preparo das diluições, foram utilizadas três séries de três tubos contendo 10 mL de caldo lauril sulfato (Merck nº 10266) contendo em seu interior tubos de Durhan invertidos para visualização do processo fermentativo. Com auxílio de uma pipeta graduada de 05 mL, retirou-se da maior diluição, 03 mL, vertendo 01 mL em cada tubo da diluição 10^{-3} no caldo lauril sulfato, em seqüência, retirou-se 03 mL da segunda maior diluição, vertendo 01 mL em cada tubo da segunda série no

caldo lauril sulfato, com o mesmo procedimento, retirou-se 03 mL da menor diluição, vertendo 01 mL em cada tubo da primeira série no tubo com caldo lauril sulfato, sendo, em seguida, incubado em estufa (Thermolyne 42000) a 37°C por 24 horas, seguido de mais 24 horas para os tubos considerados negativos, devido os fermentadores tardios da lactose. Os tubos considerados positivos apresentaram turvamento do meio e presença de gás no interior do tubo de Durhan, devido a fermentação da lactose, causada pelo microorganismo, e conseqüente produção de ácido e gás, permanecendo o gás aprisionado no interior deste tubo. Nesta etapa encerra-se o teste presuntivo para coliformes termotolerantes, anotando os tubos considerados positivos de cada diluição.

3.5.1.3 Teste confirmativo

De cada tubo considerado positivo, apresentando turvamento do meio e presença de gás no interior do tubo de Durhan, retirou-se uma alíquota, com auxílio de uma alça de níquel cromo, padronizada de 03 mm de diâmetro, semeou-se em seguida para o caldo *Escherichia coli* "caldo EC" (Merck nº 10765). A alta seletividade deste meio é proporcionada pela alta concentração de sais biliares e também devido á temperatura de incubação elevada (44,5°C). O sub-cultivo semeado em caldo EC, foi posteriormente incubado a 44,5°C +/- 0,2°C por 24 horas em banho-maria com agitador (Polyscience), dando início a etapa de teste confirmativo para coliformes termotolerantes. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram turvação do meio e presença de gás no interior do tubo de Durhan, devido a fermentação da lactose pelo microorganismo e conseqüente produção de ácido e gás. Os tubos considerados positivos de cada diluição foram anotados verificando-se o número mais provável de coliformes termotolerantes, conforme a tabela, visualizada no quadro 1.

3.5.1.4 Teste completo

A partir de cada tubo positivo do caldo EC, utilizou-se uma placa contendo ágar eosina azul de metileno, segundo Levine, (Merck nº 1342). O sub-cultivo

crescido em caldo EC foi semeado por esgotamento na superfície do ágar. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 35°C a 37°C por 24 horas. A seletividade do meio eosina azul de metileno é favorecida pela eosina amarela e o azul de metileno, que são corantes inibidores de bactérias Gram positivas. O microrganismo ao crescer fermenta a lactose, produzindo ácido, precipitando a eosina amarela e o azul de metileno, que ao se interagirem fornecem o brilho verde metálico característico da *E. coli*.

As placas que apresentaram crescimento com unidade formadora de colônia (UFC) característico para *Escherichia coli*, UFC nucleadas, com centro negro, com ou sem brilho metálico, foram semeadas em tubos contendo ágar padrão para contagem (Merck nº 05463). Semeou-se na superfície inclinada do ágar, incubando este, em estufa a 35°C por 24 horas. A partir das culturas puras em ágar padrão para contagem, confeccionaram-se esfregaços em lâminas, coradas pelo método de Gram e visualizados ao microscópio, confirmando a presença de bastonetes Gram negativos, bem como a realização das provas bioquímicas do IMViC.

3.5.1.5 Provas Bioquímicas do IMViC

Este conjunto de provas bioquímicas é composto pela prova do Indol, vermelho de metila “VM”, Voges-Proskauer “VP” e citrato, conforme preconizado por Kornacki e Johnson, 2001. Para realização das provas do IMViC, adicionou-se 0,5 mL de solução salina esterilizada a superfície do ágar padrão para contagem para obtenção de uma suspensão bacteriana espessa. Com auxílio de uma alça de níquel cromo retirou-se uma alíquota e semeou-se em toda a superfície inclinada do ágar citrato de Simmons (Merck nº 2501). Posteriormente, repicou-se, em duplicata para o caldo MR-VP (Merck nº 5712) para realização das provas de VM e VP, seguida de inoculação em caldo triptona (Merck nº 10859). O material foi incubado em estufa a 37°C por 24 horas.

O comportamento bioquímico da *E. coli* em ágar citrato de Simmons é negativo, devido a incapacidade do microrganismo em utilizar apenas o citrato de sódio como única fonte de carbono disponível, desta forma, o meio permanece inalterado, ou seja, mantendo a tonalidade esverdeada, devido a presença do indicador de pH azul de bromotimol.

Após o período de incubação do sub-cultivo em caldo triptonado, adicionou-se sobre o meio 05 gotas de reativo de Kovac's para cada 04 mL de cultura. Após leve agitação do meio, para as culturas positivas para a *E. coli*, observou-se a formação de um anel vermelho na superfície do meio de cultura, devido a presença da enzima triptofanase produzida pelo microrganismo, que degrada o triptofano em indol e escatol, sendo o último volátil, permanecendo no meio apenas o primeiro. A formação do anel vermelho na superfície do meio se dá devido a reação do indol com os componentes do reativo de Kovac's, o álcool iso amílico e o p-dimetilamino benzoaldeído. O álcool iso amílico por ser mais leve permanece na parte superior do meio de cultura, formando o anel.

Em meio MR-VP para a realização da prova de VM, após o período de incubação adicionaram-se três gotas de solução de vermelho de metila para cada 2,5 mL de meio, selecionando como positivos apenas as reações que apresentaram-se vermelhas, constatando a presença de íons hidrogênio (H^+) produzida pelo microrganismo à partir da fermentação da glicose. Para a prova do VP, utilizou-se o mesmo meio de cultura utilizado para a prova do VM, ou seja, o meio MR-VP, porém nesta prova observou-se a capacidade do microrganismo em produzir acetil metil carbinol (acetoína) a partir da fermentação da glicose. Após o prévio período de incubação do sub-cultivo, adicionou-se ao meio de cultura 0,6 mL de solução de alfa-naftol 5%, seguido de 0,2 mL de solução de KOH 40% com posterior agitação. A leitura desta prova é periódica, por até 40 minutos. O comportamento bioquímico da *E. coli* nesta prova é negativo, ou seja, o meio permanece na coloração do reagente, amarelo ou ligeiramente esverdeado.

Foram considerados como *E. coli* todas as culturas com as seguintes características: bastonetes Gram negativos, indol (+) ou (-), VM (+), VP (-) e citrato (-)

3.5.2 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp

O método de isolamento e identificação de *Salmonella* spp é dividido nas seguintes etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo diferencial, confirmação presuntiva e confirmação definitiva.

Adicionalmente foi realizada prova sorológica para a complementação da confirmação do microrganismo isolado.

3.5.2.1 Pré-enriquecimento

Após prévia homogeneização da subamostra, “swab” imerso em 25 mL de água peptonada tamponada 1%, a mesma foi vertida assepticamente em erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada tamponada 1% e em seguida, incubada em estufa a 37°C/ 24 horas, para realização da etapa de pré-enriquecimento. Tal etapa, tem como finalidade, repor as condições fisiológicas das bactérias injuriadas, neste caso, pelo processo de refrigeração.

3.5.2.2 Enriquecimento seletivo

Após o prévio período de incubação, retirou-se, com auxílio de uma pipeta graduada, 02 mL do meio água peptonada tamponada 1%, vertendo 01 mL para tubo contendo 10 mL de caldo selenito-cistina (Merck nº 7709) e 01 mL para tubo contendo 10 mL de caldo tetrionato de Kauffmann (Merck nº 10863), sendo posteriormente homogeneizados e incubados a 37°C/24 horas, sendo esta etapa denominada de enriquecimento seletivo. O caldo selenito-cistina empregado bem como o caldo tetrionato de Kauffmann possuem em sua composição substâncias inibidoras de bactérias Gram positivas, favorecendo desta forma a multiplicação apenas de bactérias Gram Negativas. A seletividade do caldo selenito-cistina é devido o selenito de sódio, já a seletividade do caldo tetrionato se deve a oxidação do tiosulfato de sódio com formação de tetrionato, pela adição de iodo ao caldo tetrionato. Outro fator que favorece o crescimento da *Salmonella* e previne o crescimento de parte da microbiota acompanhante, é a presença de carbonato de cálcio no meio, que neutraliza os ácidos que podem ser produzidos pela degradação do tetrionato por algumas bactérias.

3.5.2.3 Plaqueamento seletivo diferencial

O material cultivado crescido foi semeado por esgotamento em placas de Petri contendo meios de alta, média e baixa seletividade, respectivamente, ágar

verde brilhante (Merck nº 7236), ágar Entérico Hektoen (Merck nº 11681) e ágar MacConkey (Merck nº 5465), dando início a etapa de plaqueamento seletivo. O microrganismo ao crescer em ágar verde brilhante utiliza a peptona como fonte de nitrogênio, produzindo radicais alcalinos, desta forma, o meio que inicialmente era amarelo-esverdeado, adquire a coloração vermelha, devido a viragem do indicador de pH, vermelho de fenol que em meio alcalino, apresenta tonalidade vermelho cereja. As UFC apresentam-se róseas pálidas transparentes, em consequência da não fermentação da lactose.

O comportamento bioquímico da *Salmonella* spp em ágar Hektoen demonstra UFC transparentes a verdes azuladas com ou sem centro negro. Cepas fortemente produtoras de H₂S podem produzir UFC inteiramente negras. A presença do centro da UFC negro se dá, devido a redução do tiosulfato, que em contato com sais de metais pesados como o ferro (Fe⁺⁺⁺), produzem o precipitado negro (sulfeto). O meio que antes era verde adquire a coloração azulada, devido a utilização da peptona e do extrato de carne como fonte de nitrogênio e conseqüente produção de radicais alcalinos, havendo com isso a interação do azul de timol com o azul de bromotimol, responsáveis pela alteração da coloração do meio de verde para azul.

As placas contendo ágar MacConkey com crescimento característico para *Salmonella* spp demonstraram a presença de UFC rosa claras transparentes, devido a não fermentação da lactose pelo microrganismo.

A seletividade do ágar verde brilhante se dá devido a presença de sais biliares e verde brilhante, já no ágar Hektoen devido a presença de sais biliares e o ágar MacConkey devido a presença de sais biliares e cristal violeta, responsáveis pela inibição da microbiota Gram positiva.

3.5.2.4 Confirmação preliminar

De cada placa com comportamento bioquímico característico para *Salmonella* spp, repicou-se, em média, três UFC de cada plaqueamento, para o ágar “Ágar Triple Sugar Iron” (TSI), Merck nº 03915 e “Lisina Iron Agar” (LIA), Merck nº 11640, dando início a etapa de triagem, ou etapa de confirmação presuntiva das colônias típicas de *Salmonella* spp, na qual utiliza-se meios indicativos não seletivos, cujo fenótipo indica o microrganismo presente.

As UFC suspeitas foram semeadas em ágar TSI e ágar LIA, com uma picada na fase colunar e estrias em toda superfície inclinada do ágar. O material foi posteriormente incubado a 37°C/ 18 a 24 horas.

O comportamento bioquímico do microrganismo ao crescer em ágar TSI, demonstra na fase colunar do meio a fermentação da glicose e conseqüente produção de ácido. O meio que antes era vermelho torna-se amarelo pela viragem do indicador de pH, vermelho de fenol. Na fase intermediária observa-se a presença de H₂S, porém não são todas as cepas que produzem H₂S. Já na parte do bisel, fica vermelho, pois o microrganismo utiliza a peptona como fonte de nitrogênio, produzindo radicais alcalinos e o indicador de pH, vermelho de fenol, em meio alcalino permanece vermelho.

A reação típica de *Salmonella* spp em ágar LIA, demonstra a fase colunar, bem como o bisel púrpura sem alteração da cor do meio, com ou sem produção de H₂S. O meio fica alcalino, porque mesmo ocorrendo a fermentação da glicose com produção de ácido, a lisina é descarboxilada, produzindo um composto alcalino (cadaverina) que neutraliza o ácido formado.

Estocagem das amostras: As culturas em ágar TSI e LIA com comportamento bioquímico característico para *Salmonella* spp, foram semeadas em caldo “Brain Heart Infusion”(BHI) – Merck nº 10493, incubadas em estufa a 37°C/ 24 h, sendo posteriormente estocadas em geladeira, para em seguida serem submetidas às provas bioquímicas complementares. As amostras estocadas em caldo BHI foram constantemente repicadas em novo caldo BHI durante o período de estocagem, com o objetivo de manter o “pool” celular em fase de crescimento logarítmico (fase log), com divisão celular em ritmo constante e máxima, dessa forma, trabalhando apenas com culturas novas.

3.5.2.5 Confirmação definitiva (provas bioquímicas e sorológicas)

A partir do sub-cultivo em caldo BHI, realizou-se as provas bioquímicas complementares, constando dos seguintes testes: fenilalanina, descarboxilação da lisina e ornitina e a descarboxilação e dehidrolização da arginina, urease, malonato, indol, vermelho de metila, Voges Proskauer, citrato de Simmons, motilidade, oxidase e finalmente o teste sorológico com a utilização de soro somático polivalente.

Para realização do teste da fenilalanina, utilizou-se um inóculo substancial do caldo BHI, o qual foi distribuído em toda superfície inclinada do ágar fenilalanina (BBL nº 11537). O sub-cultivo semeado foi incubado em estufa a 37°C, efetuando-se a leitura com 24 horas, pela adição de cinco gotas de solução aquosa de cloreto férrico. A adição do cloreto férrico tem como finalidade observar se o microrganismo presente possui a enzima fenilalanina desaminase, capaz de causar a desaminação da fenilalanina (amino ácido oxidase) em ácido fenil pirúvico, que em presença de cloreto férrico, impregna o meio e principalmente a água de exsudação, com uma coloração verde, pela formação de fenilhidrazona. A *Salmonella* apresenta comportamento bioquímico negativo neste meio, pois tal microrganismo não produz a enzima fenilalanina desaminase, desta forma, após a adição do cloreto férrico, o meio permanece na coloração amarela original do reativo cloreto férrico.

Para realização das provas de descarboxilação da lisina, ornitina e dehidrolização da arginina, utilizou-se o meio ornitina descarboxilase arginina dihidrolase teste caldo base (Merck nº 6934), que foi distribuído em quatro porções idênticas quanto ao volume. Cada uma dessas porções, representou um meio, após adição de 1% de L-ornitina (Merck nº 6934) e 1% de L-arginina (Merck nº 1542) e 1% de L-lisina. A última fração não recebeu nenhum aminoácido, funcionando como controle. A partir da cultura estocada em caldo BHI, inoculou-se o sub-cultivo a ser testado nos quatro tubos com os meios, acrescentando em seguida, a cada um, algumas gotas de óleo mineral esterilizado, com o objetivo de se criar na superfície, uma fina camada de 20 mm de espessura, gerando características de anaerobiose. O material foi incubado em estufa a 37°C e acompanhado diariamente durante quatro dias. Foram considerados reações características para *Salmonella*, coloração púrpura azulada aos meios que continham aminoácidos e amarelada ao tubo testemunho. Tais reações ocorrem devido a fermentação da glicose, pelo microrganismo e conseqüente produção de ácido, dessa forma, o meio que inicialmente era púrpura torna-se amarelo. Em seguida, ocorre a descarboxilação da lisina, da ornitina e a descarboxilação e dehidrolização da arginina, resultando na produção de radicais alcalinos (gás carbônico e amônia), novamente o meio adquire coloração púrpura azulada.

Para realização do teste da urease transferiu-se um inóculo do caldo BHI para o caldo uréia (Merck nº 8483), com posterior incubação em estufa a 37°C/24h. A finalidade deste teste é de observar se o microrganismo presente possui a enzima

urease, capaz de hidrolizar a uréia em moléculas de carbonato amônia, aumentando consequentemente o pH. O indicador de pH, vermelho de fenol em meio alcalino altera a cor do meio de pêssego (teste negativo) para cor de rosa escuro (teste positivo). A maioria das cepas de *Salmonella* spp são urease negativas.

No teste do malonato, inoculou-se a partir da cultura estocada em caldo BHI um inóculo substancial para o caldo malonato (Merck nº 5419), incubando posteriormente em estufa a 37°C/24-48h. Como a maioria das cepas de *Salmonella* spp são malonato-negativas, selecionou-se como comportamento bioquímico característico as amostras que permaneceram com a cor verde do meio inalterada.

Para realização do teste do indol, adotou-se a mesma técnica já descrita na seção 3.5.1.5 para bioquímica da *E. coli*, porém o comportamento bioquímico da *Salmonella* spp em tal meio difere do comportamento da *E. coli*, visto que a maioria das cepas de *Salmonella* spp são indol-negativas, formando na superfície do tubo um anel amarelo, devido a ausência da enzima triptofanase.

A realização das provas bioquímicas de VM e VP seguem as mesmas instruções já descritas na seção 3.5.1.5 e o mesmo comportamento bioquímico para ambos os microrganismos pesquisados, ou seja são VM positivas e VP negativas.

A prova do citrato de Simmons segue as mesmas instruções já descritas na seção 3.5.1.5, porém as cepas de *Salmonella* spp apresentam comportamento bioquímico positivo neste meio, ou seja, conseguem crescer em meio que fornece apenas citrato de sódio como única fonte de carbono disponível e cristais de amônia como única fonte de nitrogênio, em um meio mineralizado, produzindo desta forma radicais alcalinos. O indicador de pH azul de bromotimol em meio alcalino, muda a cor do meio de verde para azul.

Para realização do teste de motilidade utilizou-se o ágar sulfeto indol motilidade - SIM - (Merck nº 5470), com uma picada central do meio, atingindo até uma profundidade de 0,5 cm. O material inoculado foi incubado em estufa a 37°C/24h. As cepas do gênero *Salmonella* spp, exceto as espécies *Salmonella gallinarum* e a *Salmonella pullorum*, são móveis, sendo a motilidade evidenciada pelo crescimento difuso em toda a extensão do meio. Em caso de microrganismo imóvel o crescimento ocorre somente na região da picada efetuada quando da inoculação do meio. A maioria das cepas de *Salmonella* são produtoras de H₂S, evidenciada pela coloração negra que se difunde no meio, sendo esta reação independente da motilidade do microrganismo.

Para realização do teste de oxidase, esterilizou-se tiras de papel Waltman nº 1 em autoclave (121°C/15 minutos), colocando em seguida em estufa para secagem completa das tiras. As tiras foram embebidas em solução aquosa de cloridrato de tetrametil parafenileno diamino a 1%. Após prévia secagem das tiras, efetuou-se o teste das amostras suspeitas estocadas em caldo BHI. Retirou-se uma gota, com auxílio de um bastão de vidro, previamente flambado e esfriado na zona de segurança do bico de Bunsen e depositou-se sob a superfície da fita. A leitura foi feita por até 60 segundos, para a observação do aparecimento de uma coloração azul púrpura (teste positivo) ou o não aparecimento de tal coloração (teste negativo). As cepas de *Salmonella* spp são oxidase-negativas, ou seja, durante o período observado, nenhuma reação se desenvolve no local.

Foram consideradas como reações típicas para *Salmonella* spp as seguintes características: reações típicas em TSI e LIA, e os seguintes teste: fenilalanina (-), descarboxilação da lisina (+), descarboxilação da ornitina (+), descarboxilação e dehidrolização da arginina (+), malonato (-), urease (-), indol (-), VM (+), VP (-), citrato (+), motilidade (+), oxidase (-).

Os cultivos com perfil bioquímico característico para *Salmonella* spp, foram semeados em caldo BHI, incubadas a 37°C por 24 horas, para obtenção de culturas bacterianas em fase de crescimento exponencial, para posterior realização da caracterização sorológica, conforme preconizado pelo fabricante (PROBAC do Brasil).

Para caracterização sorológica, foi realizada a técnica de aglutinação em lâmina, com o soro *Salmonella* – polivalente somático (PROBAC do Brasil), que contém anticorpos contra antígenos O das salmonelas dos grupos A, B, C, D e E. O soro foi submetido a prova de auto-aglutinação, conforme especificações do fornecedor, para comprovar a eficácia e evitar falsa interpretação.

A partir de culturas recentes em caldo BHI, repicou-se para o meio semi sólido EPM, que fornece em um único tubo, informações quanto aos testes de produção de gás a partir da fermentação da glicose, H₂S, urease e 1-triptofano desaminase. Inoculou-se com agulha de platina, toda superfície inclinada do meio semi sólido de EPM e a base com uma picada central até o fundo do tubo. O material foi incubado a 37°C durante 20 a 24 horas. A partir do crescimento neste meio, foi adicionado 0,2 mL de solução salina esterilizada, para obtenção de uma suspensão bacteriana espessa. Em uma placa de aglutinação foi colocado uma gota da suspensão

bacteriana juntamente com uma gota padrão do soro somático polivalente, utilizando um área de 1,5 cm de diâmetro, com movimentação da placa de modo que a mistura suspensão/soro se deslocasse fácil e continuamente, durante um a dois minutos. Foram consideradas positivas as reações de aglutinação ocorridas dentro de dois minutos.

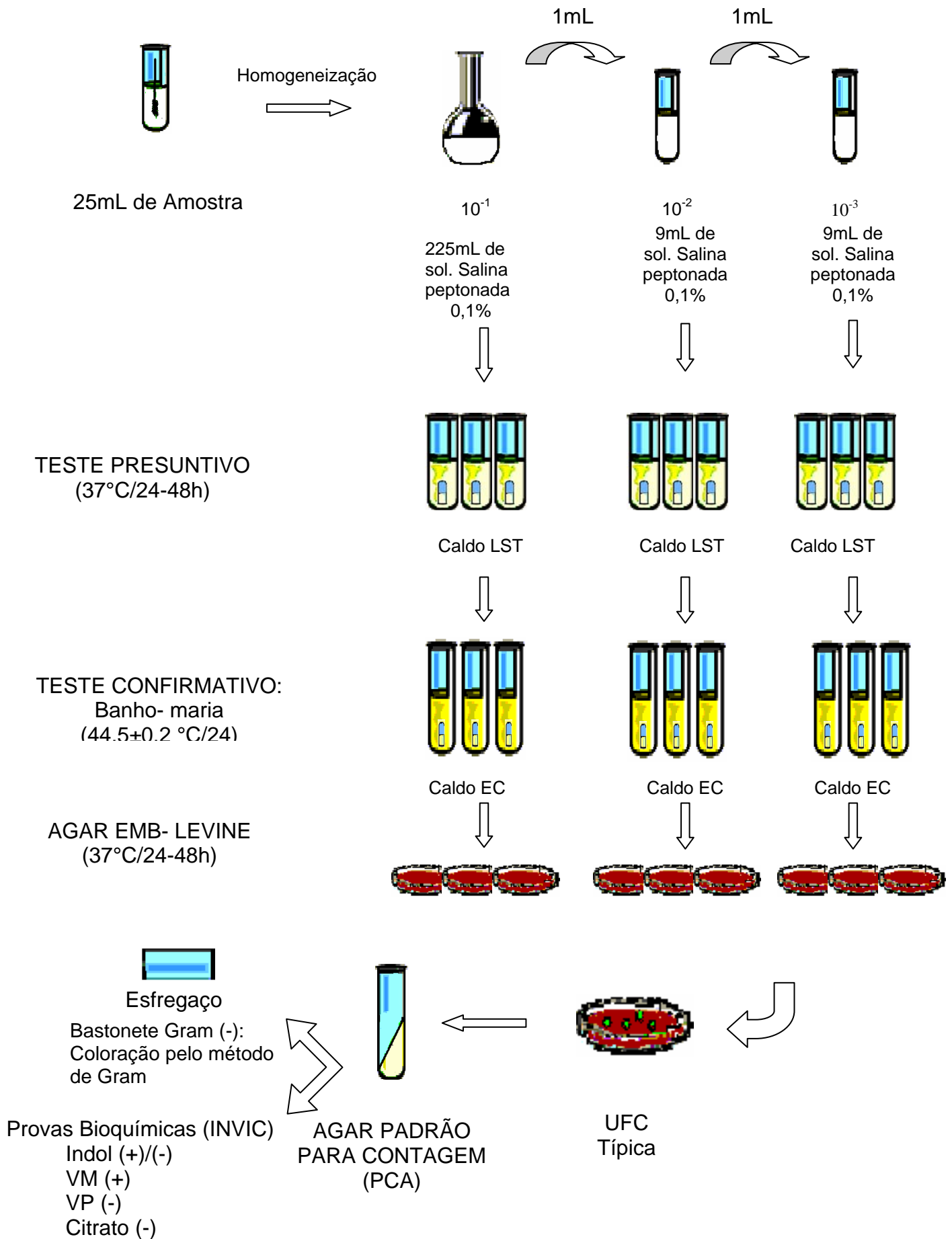
Verificou-se previamente a eficiência do soro somático polivalente realizando o teste de autoaglutinação com uma gota de soro e uma gota de solução salina, verificando ausência de aglutinação.

Todas as amostras submetidas ao meio semi sólido de EPM, recomendado por Toledo, Fontes e Trabulsi, 1998, para realização do teste sorológico somático polivalente, demonstraram reação bioquímica característica de *Salmonella* spp, dessa forma, confirmando os resultados obtidos na seriação bioquímica convencional recomendada por Andrews et al., 2001.

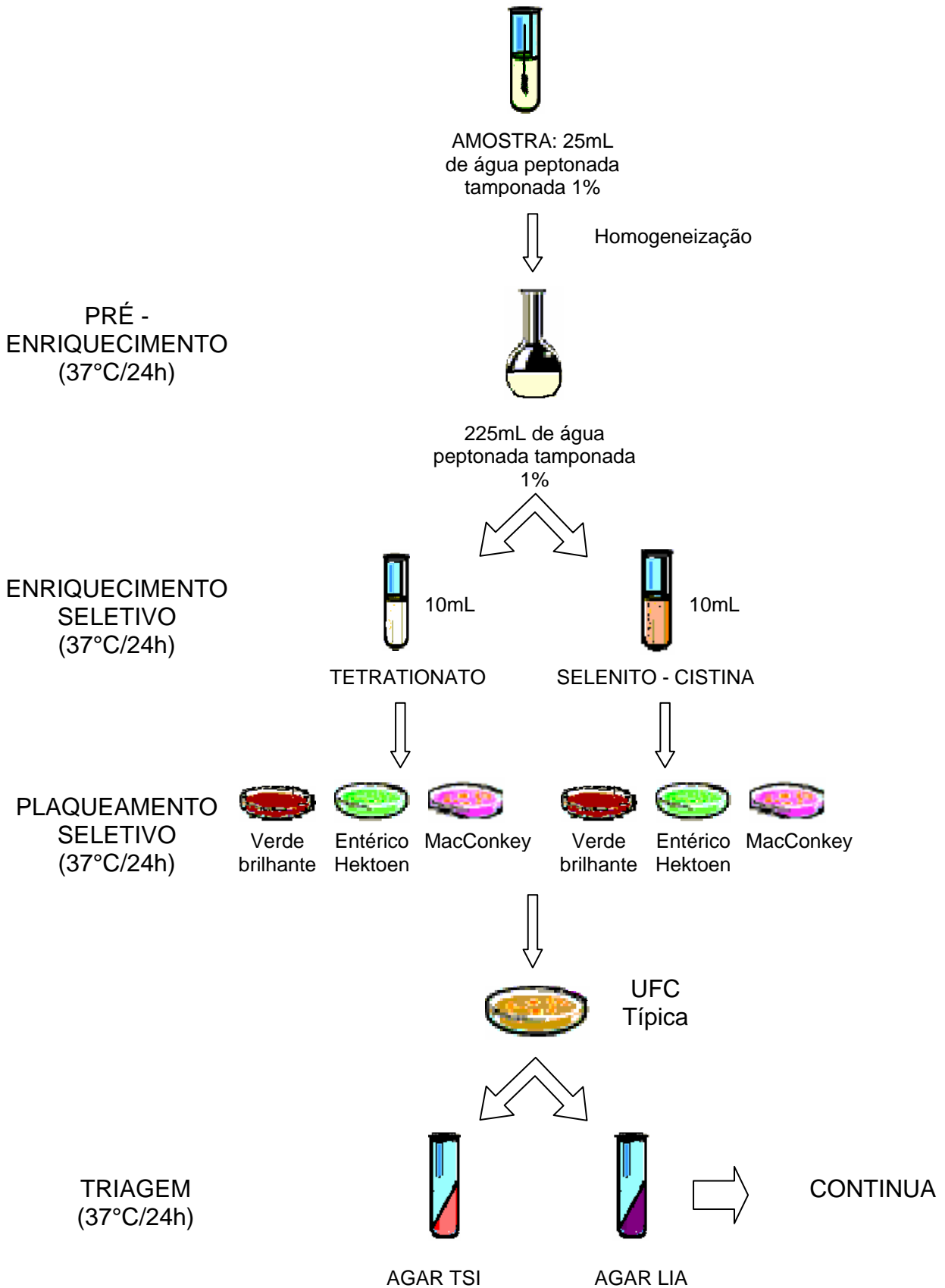
Todas as amostras foram submetidas ao esfregaço em lâminas e coradas pelo método de Gram, para verificação da pureza da cultura, observando apenas a presença de bastonetes Gram negativos.

As cepas que apresentaram testes bioquímicos e morfotintoriais característicos, confirmados com a aglutinação dentro do tempo previsto, foram consideradas pertencentes ao gênero *Salmonella* spp.

3.5.3 Enumeração de coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*)



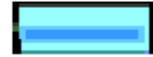
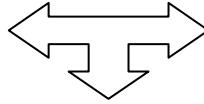
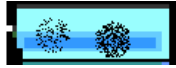
3.5.4 Isolamento e identificação de *Salmonella*



CONTINUAÇÃO



Caldo BHI



TESTE SOROLÓGICO

Aglutinação (+):
Soro + suspensão
bacteriana

CARACTERÍSTICAS
FENOTÍPICAS

Fenilalanina (-)
Uréia (-)
Oxidase (-)
Malonato (-)
O/F testemunho (-)
L –arginina (+)
L –ornitina (+)
L –lisina (+)
Indol (-)
VM (+)
VP (-)
Citrato (+)
Motilidade (+)

ESFREGAÇO EM LÂMINA

Bastonete Gram (-):
Coloração pelo método
de Gram

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise estatística dos dados foi determinada pela média aritmética, variação entre as médias, adotando-se análise de variância, teste T, q- quadrado e teste de McNEMAR, com intervalo de confiança de 95%, com margem de erro de 5%.

4 RESULTADOS

De um total de 80 amostras avaliadas, observou-se que 53 (66,25%) apresentaram temperatura superior a estabelecida pela portaria 304 de 22/04/1996, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Brasil, 1996), na qual estabelece a temperatura máxima para recepção da carne bovina no comércio varejista em 7°C (Figura 1)

De 40 amostras verificadas em cada estabelecimento, 25 (62,50%) no estabelecimento A e 28 (70,00%) no estabelecimento B, apresentaram temperatura acima de 7°C. A projeção destes dados é melhor evidenciada nas figuras 2 e 3.

Com relação ao parâmetro físico-químico de potencial hidrogênio-iônico (pH), tomando por base o RIISPOA (BRASIL, 1997), verificou-se que de um total de 80 (100%) amostras analisadas, apenas três (3,75%) das amostras apresentaram-se fora do padrão estabelecido pela referida legislação, sendo valores acima de 6,40 considerados em início de decomposição.

Todas as amostras de pH obtidas no estabelecimento A encontravam-se com índices abaixo do permitido pelo RIISPOA (BRASIL, 1997), situando-se na faixa de 5,50 a 6,27, já com relação as amostras coletadas no estabelecimento B, três destas encontravam-se com percentual acima de 6,40. O restante das amostras (37) do último estabelecimento encontravam-se na faixa de 5,50 a 6,38 (Quadro 3).

Comparando os resultados obtidos antes e após o processo de desossa nos referidos estabelecimentos, quanto a enumeração coliformes termotolerantes, constatou-se que o processo de desossa realizado nestas casas atacadistas, não influencia de maneira significativa na qualidade bacteriológica do produto final analisado. Entretanto, observou-se que do total de amostras analisadas, (21) 26,25% demonstraram aumento do percentual de contaminação por coliformes

termotolerantes, após o processo de desossa, porém tal valor não é estatisticamente significativo para comprovar que o processo de desossa influenciou na qualidade bacteriológica final, quanto a este microrganismo pré-citado.

Analisando, separadamente, os estabelecimentos pesquisados, observou-se que no estabelecimento A 14 (35,00%) das amostras demonstraram aumento do valor do NMP de coliformes termotolerantes após o processo de desossa. Nas demais 26 (65,00%) das amostras, os valores de NMP permaneceram o mesmo. Já o estabelecimento B apenas 7 (17,50%) das amostras apresentaram valor de NMP de coliforme termotolerante maior após o processo de desossa, representando metade do aumento de contaminação do estabelecimento A. As demais 33 (82,50%) das amostras apresentaram NMP abaixo do padrão recomendado pela USDA, 1996. Este dado é visualizado na figura 4.

Foram identificadas 97,50% das amostras obtidas antes da desossa no estabelecimento A, contaminadas por *E. coli*, já após a desossa 100% das amostras apresentaram-se contaminadas pelo patógeno. Valores próximos foram observados no estabelecimento B, visto que 95,00% e 97,50% apresentaram-se contaminadas por *E. coli*, respectivamente, antes e após a desossa.

Ainda com relação à presença de coliformes termotolerantes, especificamente, *E. coli*, uma atenção especial deve ser dispensada no que se refere ao elevado nível de contaminação da meia carcaça bovina recebida no comércio varejista, do referido município, por este microrganismo. De um total de 40 (100%) das amostras do estabelecimento A, 17 (42,50%) das amostras demonstraram valor de NMP de coliforme termotolerante superior a 10^2 NMP/cm² de alimento. O estabelecimento B demonstrou percentual relativamente menor, visto que, de um total de 40 (100%) das amostras, 13 (32,50%) das amostras apresentaram NMP de coliformes termotolerantes superior a 10^2 NMP/cm² de alimento.

Com relação ao isolamento e identificação de *Salmonella* spp, ambos estabelecimentos apresentaram contaminação por tal patógeno. Analisando o total de amostras obtidas nos estabelecimentos pesquisados, em etapas distintas (antes e após o processo de desossa da carne bovina), verificou-se um aumento de amostras contaminadas por tal patógeno, de 12,50% para 20,00% após o processo de desossa (Figura 5).

No que se refere ao nível de contaminação por *Salmonella* spp entre os estabelecimentos pesquisados, constatou-se que o maior nível de contaminação por esta bactéria foi verificada no estabelecimento A, sendo 14 (17,50%) amostras positivas para *Salmonella*, comparadas a 12 (15,00%) de positividade para o referido patógeno no estabelecimento B, dado este demonstrado na figura 6.

Apesar da maior proporção de amostras contaminadas por *Salmonella* spp ter sido isolada no estabelecimento A, a maior proporção isolada antes do processo de desossa foi verificada no estabelecimento B, de acordo com a figura 7 e a maior proporção isolada após a desossa, foi obtida no estabelecimento A, verificada na figura 8.

De um total de 40 amostras obtidas antes da desossa, no estabelecimento A, 4 (10,00%) confirmaram presença de *Salmonella* spp em 10 cm², porém nas amostras obtidas após a desossa, a presença de tal patógeno, fora significativamente maior, com presença de *Salmonella* spp em dez amostras (25,00%), comprovando diferença estatística significativa, com base no teste de McNemar, ao nível de significância de 5% ($p=0,031$). Os resultados obtidos para o estabelecimento B foram próximos aos obtidos no estabelecimento A, nas amostras iniciais, apresentando presença de *Salmonella* spp em seis (15,00%) de um total de 40 amostras, porém as amostras obtidas após a desossa apresentaram o mesmo percentual de contaminação (15,00%) das amostras iniciais. Tais dados são visualizados na figura 9.

Não houve diferença estatística significativa quando comparamos a positividade entre os estabelecimentos A e B ($p = 0,070$) para presença de *Salmonella* spp.

Todos os resultados obtidos nesta pesquisa são visualizados na figura 10, mostrando os valores médios do NMP de coliformes termotolerantes, positividade de *Salmonella* spp antes e após a desossa e valores médios de pH e de temperatura das meias carcaças bovinas analisadas, no município de Cuiabá – MT.

Figura 1: Temperatura média de recepção da carne bovina no comércio varejista dos estabelecimentos pesquisados.

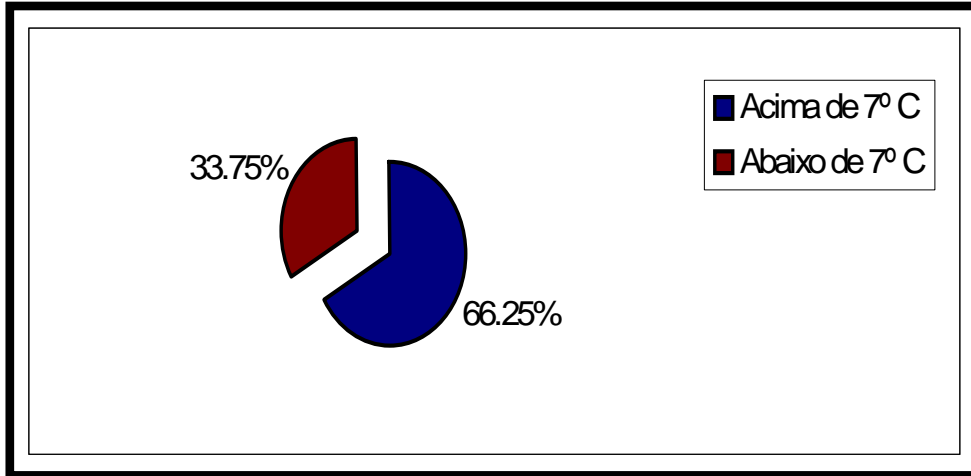


Figura 2: Proporção das amostras de carne bovina do estabelecimento A com temperatura acima do permitido pela legislação vigente.

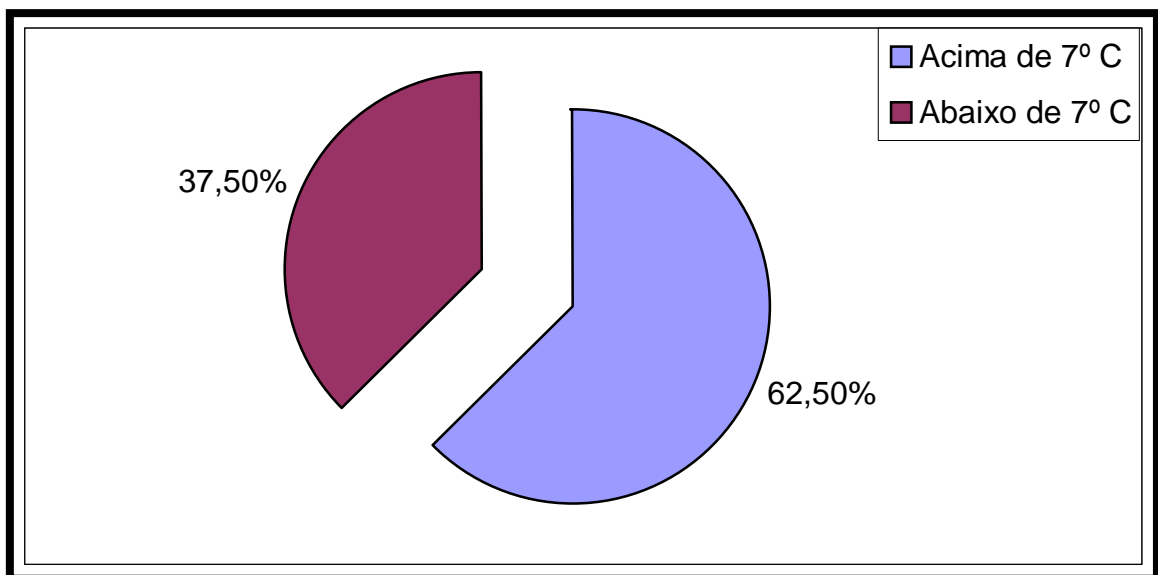


Figura 3: Proporção das amostras de carne bovina do estabelecimento B com temperatura acima da permitida pela legislação vigente.

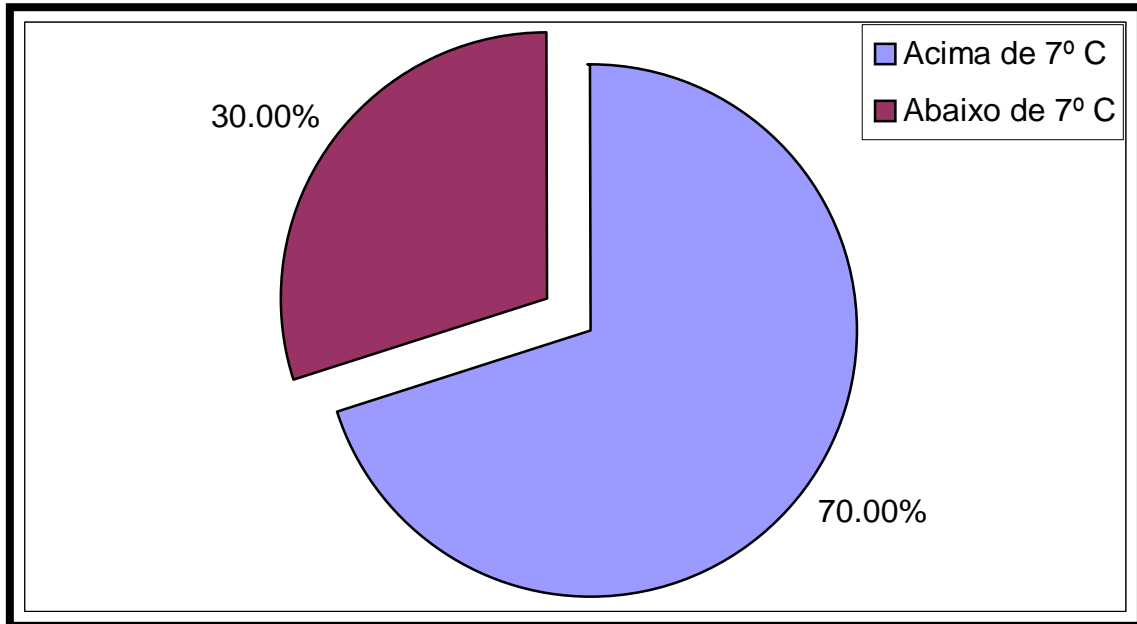


Figura 4: Amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) que demonstraram aumento do valor do NMP após o processo de desossa.

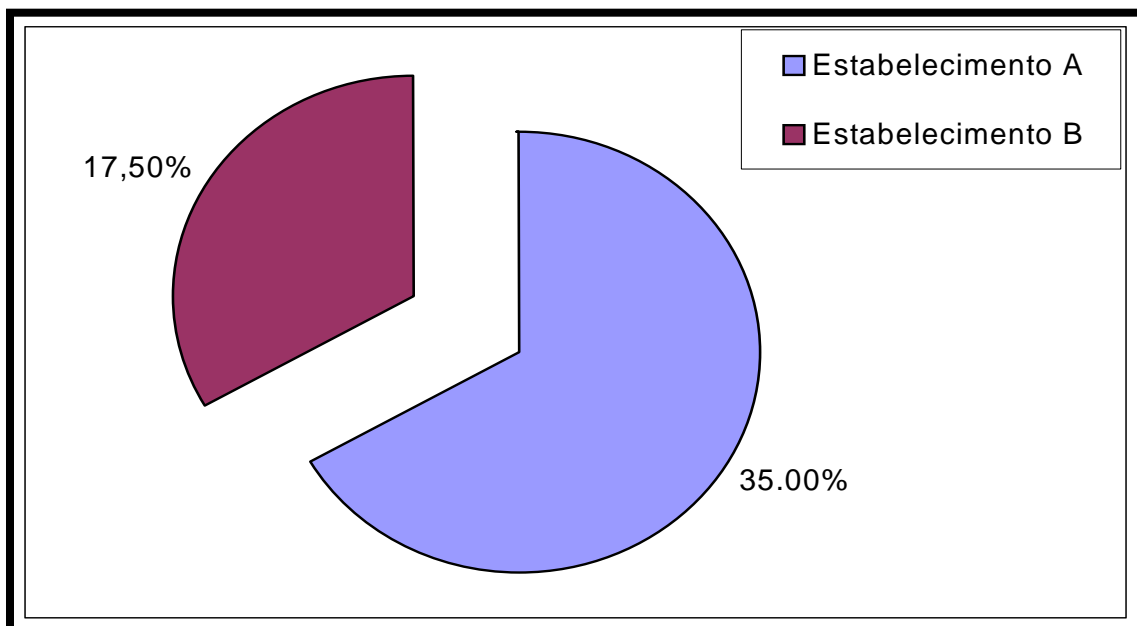


Figura 5: Percentual total de amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* antes e depois da desossa.

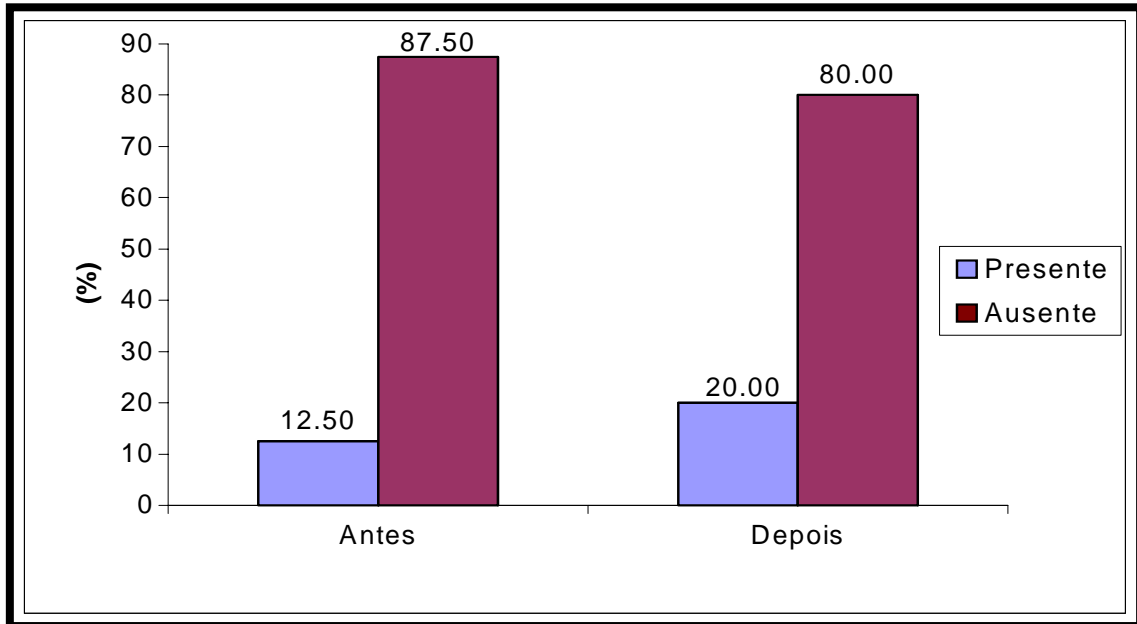


Figura 6: Percentual total de amostras de carne bovina obtidas (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* analisadas nos estabelecimentos varejistas A e B.

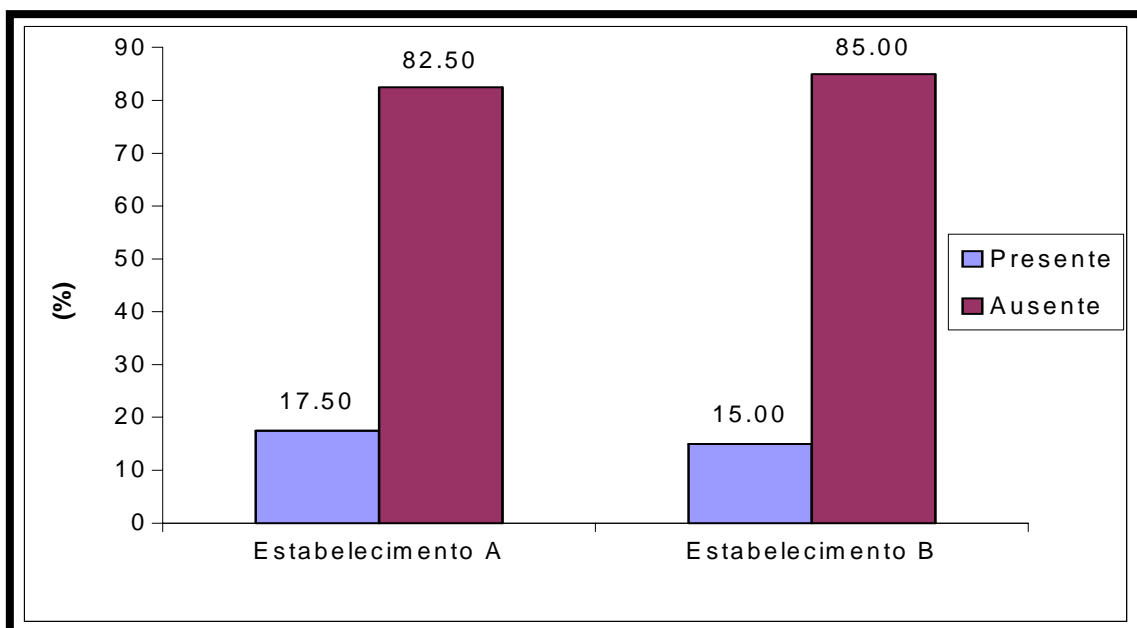


Figura 7: Percentual de amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* antes da desossa nos estabelecimentos varejistas A e B.

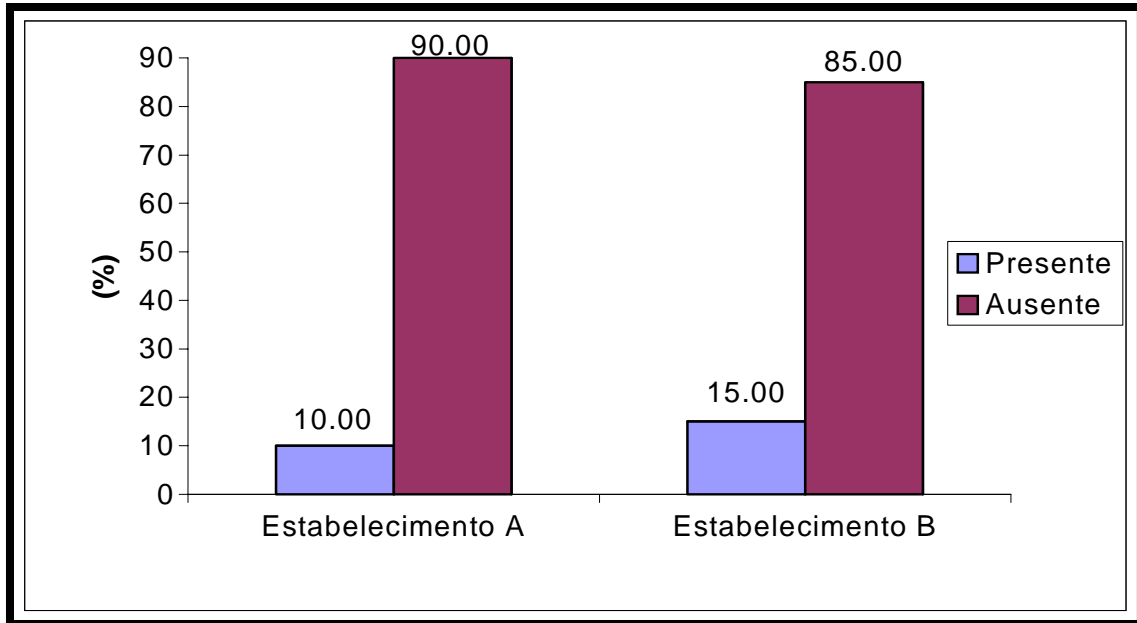


Figura 8: Percentual de amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* depois da desossa, nos estabelecimentos varejistas A e B.

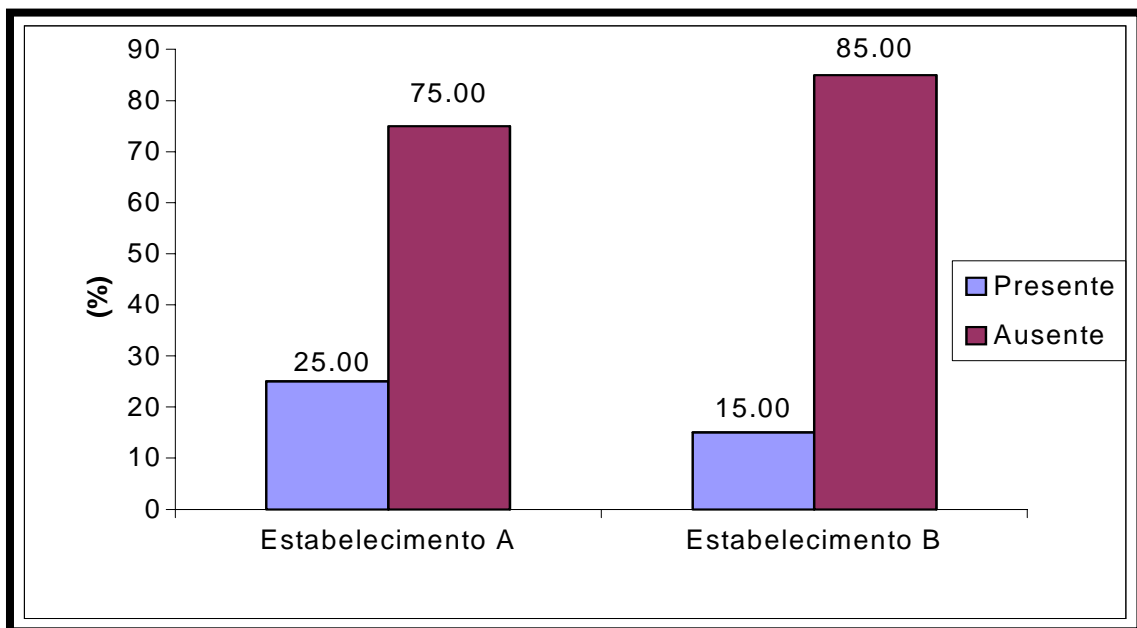


Figura 9: Amostras de carne bovina (*Tensor fasciae latae*) contaminadas por *Salmonella* antes e depois da desossa nos estabelecimentos varejistas A e B individualmente.

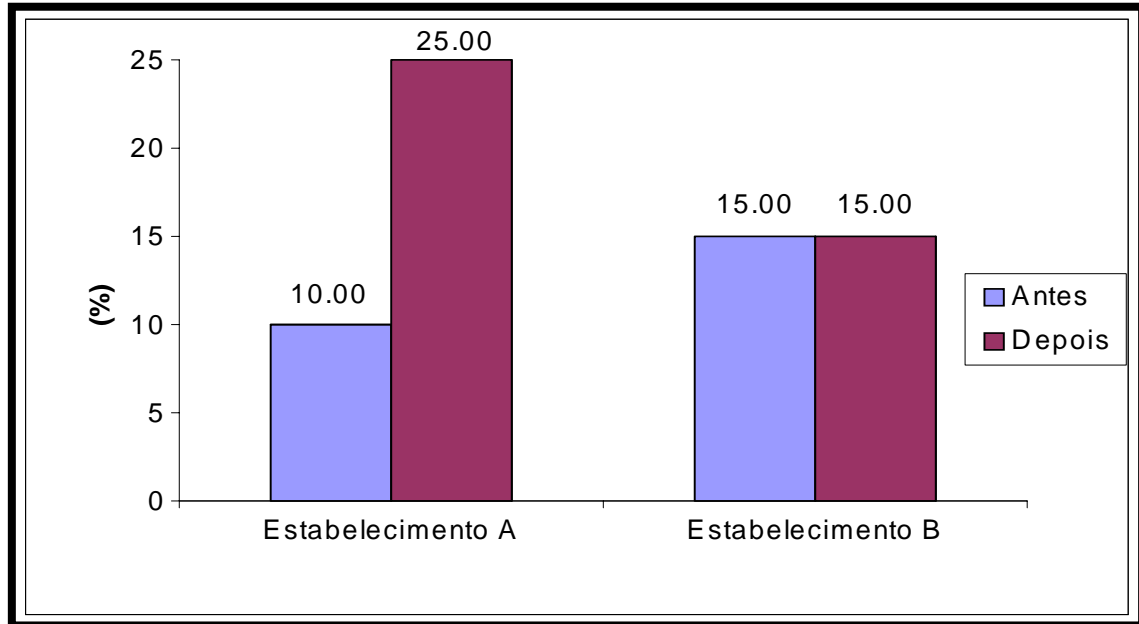
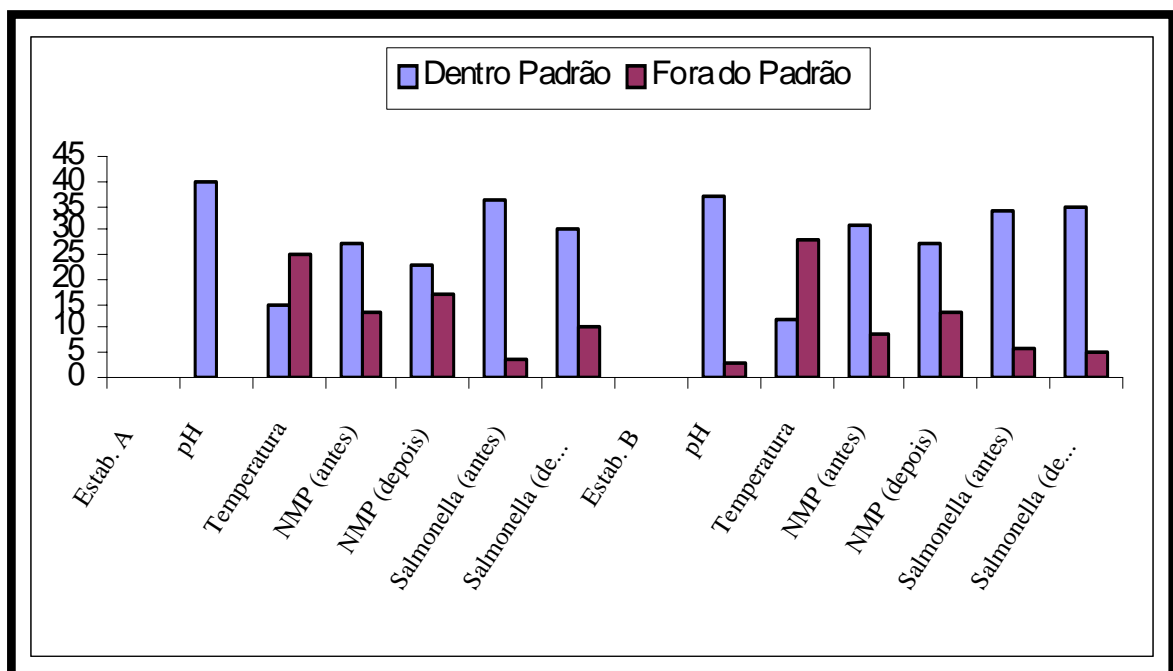


Figura 10: Parâmetros bacteriológicos e físico-químicos das amostras de carne bovina analisadas, obtidas nos estabelecimentos comerciais pesquisados, enquadrados dentro e fora dos padrões mencionados.



5 DISCUSSÃO

Segundo Nottingham, 1982, o fator mais importante na seleção da microbiota da carne fresca é a temperatura. Esta não só determina o aumento ou redução do número de contaminantes, como também influencia na natureza da microbiota que se tornará dominante.

No presente trabalho pode-se verificar que não existe cadeia do frio eficiente nos estabelecimentos estudados no município de Cuiabá - MT, visto que, a carne bovina descarregada nas casas atacadistas, do referido município, é oriunda de cidades vizinhas, sendo transportadas em caminhões sem refrigeração. Sabe-se que, a carne bovina possui em sua constituição aproximadamente 75,00% de seu peso em água, rica em nutrientes e seu pH próximo à neutralidade, tornando a mesma extremamente susceptível ao processo de deterioração. Desta forma, a carne sendo transportada sem refrigeração por longas horas e com uma pequena carga de contaminação superficial, torna a mesma imprópria para o consumo humano em algumas horas.

Com relação à temperatura de recebimento da carcaça, em ambos estabelecimentos, de um total de 80 amostras, foi possível constatar que 53 (66,25%) das amostras estavam em desacordo com a legislação vigente. De acordo com a portaria 304/96 (BRASIL, 1996) os cortes de carne bovina devem chegar ao varejo com temperatura máxima de 7°C, parâmetro este que não é respeitado, visto que 66,25% das amostras estavam com temperaturas superiores a 7°C.

Os autores Veras, Blum e Silva, 2001, também observaram que as amostras obtidas em estabelecimentos comerciais localizados em áreas de menor poder econômico da cidade do Rio de Janeiro, demonstraram que as temperaturas médias

foram mais altas quando comparadas com a média da temperatura das amostras localizadas em área de maior poder econômico.

Resultados semelhantes também foram observados por Gunvins e Bogh, 1989 em seu estudo, verificando as condições em que a carne era submetida do ponto de produção até o estabelecimento retalhista. Estes autores verificaram que os limites de temperatura de 7°C foram freqüentemente ultrapassados, sendo sua maior razão o insuficiente isolamento térmico dos veículos que promoviam o seu transporte. Porém Lima, 1998 em sua pesquisa verificou algo mais alarmante, a não aplicação do frio imediatamente após o abate e durante o transporte da mesma, em uma parcela da carne bovina comercializada no Estado do Ceará, devido a incapacidade numérica de câmaras frias nos frigoríficos da região e a ausência de refrigeração nos caminhões que transportavam a carne bovina até o mercado varejista.

O transporte da carne bovina sem refrigeração também foi observado por Fliss, Simard e Ettriki, 1991b, em sua pesquisa em abatedouros na Tunísia, sendo o transporte realizado sem refrigeração do abatedouro até os mercados varejistas, dessa forma, fornecendo condições para o crescimento bacteriano, assim como a contaminação cruzada. Dado este também observado, nesta pesquisa, verificando o transporte da carne bovina em caminhões isotérmicos, sem refrigeração, sendo recebida nos estabelecimentos comerciais acompanhados, com temperatura média de 10°C, variando de 4,1°C a 15,6°C.

Segundo Pardi et al., 2001, a desossa realizada em casas atacadistas, não é capaz de obter uma carne que mantenha as desejáveis condições de higiene e conservabilidade, uma vez que recebem um produto com uma carga microbiana aumentada em razão da quebra do ciclo do frio e da ausência de controle da atmosfera nos locais de trabalho, além da falta de fiscalização higiênico-sanitária permanente de operadores. O presente trabalho confirmou, pelos dados obtidos, este aspecto, visto que a cadeia do frio não atende aos parâmetros previstos pela legislação nacional, sendo a carne transportada por longas horas em temperatura ambiente, devido a ausência do dispositivo “thermo king” nos caminhões que realizam o seu transporte. Além deste fator, existem inúmeros outros que contribuem para a perda da qualidade do produto, como a existência da figura do “lombador”, prática comum em todo o território brasileiro.

A portaria 145 de 01 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997), estabelece a obrigatoriedade de se obter autorização específica junto ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem (DIPOA), para realização de desossa. Na prática, os varejistas precisam seguir as seguintes exigências: possuir serviço de inspeção federal, estadual ou municipal; requerer a adesão ao programa às autoridades competentes, apresentando projeto para transformação em “entrepasto com desossa aprovada”, adequando-se as normas da Portaria nº 368/97 (BRASIL, 1997), do Ministério da Agricultura, que aprovou o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores e Industrializadores de Alimentos; além de cumprir o Código de Postura Municipal. Apesar da obrigatoriedade imposta à partir de 1998, junto a tais estabelecimentos comerciais, esta portaria ainda não está efetivamente em prática de fato, sendo comprovado pelo presente trabalho, no qual verificou-se em um universo de 1500 estabelecimentos comerciais que recebem, desossam e manipulam carne bovina, espalhados em todo o município, apenas um estabelecimento, possui o título de entreposto com desossa aprovada. De acordo com informações da Vigilância Sanitária Municipal, os estabelecimentos comerciais em Cuiabá que realizam desossa não possuem serviço de inspeção federal, estadual ou municipal e não aderiram ao programa para transformação em entreposto com desossa aprovada, desta forma, atuando na ilegalidade.

Com relação aos valores médios obtidos ao determinar o pH da carne bovina em ambos estabelecimentos não houve diferença estatística significativa entre o supermercado localizado em área central e periférica da cidade de Cuiabá- MT. Resultado semelhante foi encontrado por Veras, Blum e Silva, 2001, avaliando a temperatura, pH e maciez das carnes bovinas comercializadas em açougues e supermercados da região do grande Rio de Janeiro. Estes autores também não encontraram diferença estatística significativa nos valores médios de pH da carne bovina comercializada em locais de alto e baixo poder econômico.

Entende-se ser conveniente referir-se a dois pontos fundamentais, tais como: a) de acordo com o LANARA (BRASIL, 1981) carne bovina com valores de pH entre 6,20 a 6,40 pode ser comercializada apenas para consumo imediato, sendo este limite crítico para consumo, desta forma a porcentagem de amostras de carne bovina dentro do referido limite crítico encontra-se na ordem de 12,5%, ou seja, 10 amostras de um total de 80 (100%) amostras e b) porém Silva, 1985, estabelece

uma faixa de pH de 5,60 a 6,00 para carne considerada boa para o consumo e as que apresentam-se na faixa de 6,00 a 6,40, apesar de serem ainda consideradas em condições de consumo, o autor sugere a aplicação de outras provas antes de sua liberação ao consumo. Desta forma, aplicando os dados utilizados como parâmetros do último autor neste trabalho, de um total de 80 (100%) das amostras analisadas, 17 (21,25%) das mesmas, apesar de serem ainda consideradas em condições de consumo, necessitaria da aplicação de outras provas antes de sua liberação ao consumo.

Embora a Resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001), não estabeleça padrão de identidade e qualidade para presença de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* para carne *in natura*, os valores encontrados para o microrganismo em questão, sugerem que a carne bovina comercializada no município de Cuiabá – MT, representa risco à população, devido o alto índice de contaminação encontrada na amostragem inicial (“swab” obtido antes da desossa), além da possibilidade da presença de cepas patogênicas de *E. coli* nesta parcela da carne bovina analisada.

Observou-se em um total de 80 amostras analisadas (estabelecimento A e B), 30 (37,50%) apresentaram NMP com valores acima de 10^2 bactérias /cm² de alimento, padrão este estabelecido pela USDA, 1996, aos países exportadores de carne bovina para os EUA. Das 40 amostras analisadas em cada estabelecimento, para o microrganismo em questão, 17 (42,50%) e 13 (32,50%) apresentaram NMP com valores acima de 10^2 bactérias /cm² de alimento, respectivamente para estabelecimento A e B.

Inúmeros fatores podem ter desencadeado este elevado índice de contaminação inicial da meia carcaça bovina, a começar por falhas durante a operação de abate, a não aplicação rápida e eficiente do frio industrial logo após o abate, bem como a não continuidade do mesmo durante o transporte até os mercados varejistas. Além dos fatores supra citados outros fatores podem ter agravado o índice de contaminação da meia carcaça bovina recebida nos mercados varejistas acompanhadas como o transporte em caminhões isotérmicos, sendo a carne mantida em temperatura ambiente por horas. Convém ressaltar que a temperatura ambiente da cidade de Cuiabá atinge facilmente 40°C em determinadas épocas do ano, dessa forma contribuindo para o aumento da temperatura da meia carcaça, assim como favorecendo um aumento da microbiota superficial do produto. Em condições ideais de calor, umidade e nutriente, as bactérias se multiplicam em

média a cada 20 minutos, dado este de extrema importância, em especial quando a carga microbiana é elevada e os demais fatores como, tempo/temperatura de transporte são elevados, tendo como consequência a intensa multiplicação bacteriana, tornado a carne uma fonte de veiculação de ETA.

Outro fator a se considerar é o acondicionamento inadequado das meias carcaças no interior do caminhão isotérmico, sendo agrupadas em lotes em contato íntimo entre as meias carcaças (foto 2).

De acordo com Gill, 1996a a contaminação da superfície da carcaça é a base dos problemas, tanto para conservação da qualidade da carne como para a saúde pública. Entre os possíveis microrganismos patogênicos presentes na superfície da carcaça, atenção especial deve ser dada a *Escherichia coli*, por ser um dos microrganismos patogênicos com potencial a desenvolver-se em temperaturas de refrigeração.

Ainda ao que se refere à influência do processo de desossa na qualidade bacteriológica da carne bovina, com relação a enumeração de coliformes termotolerantes, observou-se nesta pesquisa que o estabelecimento localizado na periferia da cidade (A), demonstrou maior nível de contaminação após o processo de desossa, quando comparado com os resultados obtidos no estabelecimento localizado na área central da cidade (B). Estes resultados podem ser “vinculados” a inúmeros fatores como treinamento inadequado dos desossadores, local inadequado para higienização das mãos e dos equipamentos e utensílios como, facas, ganchos, etc, (foto 3), como local impróprio para armazenamento dos mesmos (foto 4).

Em ambos estabelecimentos pesquisados, o acondicionamento da meia carcaça durante o transporte do frigorífico até os mercados varejistas procedeu-se da mesma forma inadequada, porém o transporte da mesma do caminhão até a sala de desossa apresentou diferença entre os estabelecimentos pesquisados. O transporte da meia carcaça no estabelecimento A foi realizado com auxílio do “lombador” (foto 5) enquanto no estabelecimento B o transporte do produto em questão, procedeu-se por trilhamento aéreo, do caminhão até a sala de desossa (foto 6).

Verificou-se nesta pesquisa que 12,50% do total de 80 (100%) amostras de carne bovina analisadas antes da desossa em ambos estabelecimentos, encontravam-se contaminadas por *Salmonella* spp, sendo consideradas impróprias para o consumo, de acordo com a Resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001). Valores

ainda maiores foram verificados após a desossa, aumentando de 12,50% para 20,00% das amostras contaminadas por este patógeno, comprometendo ainda mais uma parcela da carne bovina comercializada.

Apesar de ter sido verificado o aumento do nível de contaminação por *Salmonella* spp, deve-se ressaltar que o aumento de amostras contaminadas por tal patógeno só foi verificado no estabelecimento A, mantendo o mesmo nível de contaminação antes e depois da desossa no estabelecimento B. O dado obtido no estabelecimento B constata que o produto já apresentava a presença do patógeno antes do processo de desossa, caracterizando uma contaminação prévia do produto analisado pelo patógeno citado.

Especula-se que o fato do maior nível de contaminação encontrado no estabelecimento A após o processo de desossa, seja devido um somatório de fatores como: falhas durante o processo de desossa, como ausência de esterilizadores de facas e ganchos, condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, bem como da precariedade da estrutura física da sala de desossa, falta de treinamento dos funcionários que fazem parte da equipe (desossadores e atendentes).

Silliker e Gabis, 1986, bem como Varnam e Evans, 1996, consideram ser comum a presença de *Salmonella* em carne crua e em aves, pois esta pode fazer parte da microbiota destas matérias-primas. Tal aspecto, também foi considerado por Giombelli e Silva 2001 em sua pesquisa realizada com carnes *in natura*, obtendo como resultado a presença de *Salmonella* spp em 48 (50,50%) das 95 (100%) amostras de carne *in natura* analisadas.

A pesquisa realizada pelos autores Almeida, Gonçalves e Franco, 2002, sobre a presença de *Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moída, foi verificada pelos autores que os isolamentos de salmonelas foram provenientes de amostras obtidas em estabelecimentos comerciais, onde as condições higiênico-sanitárias de utensílios, equipamentos, pessoal e do ambiente em geral, encontravam-se abaixo do padrão aceitável, enquanto que as amostras que caracterizaram ausência de *Salmonella* procederam dos estabelecimentos onde as condições higiênico-sanitárias apresentavam-se adequadas, demonstrando que as mesmas são de suma importância para o fornecimento de alimentos que não exponham a população ao risco de adquirir uma enfermidade de origem alimentar.

Resultados semelhantes foram obtidos na pesquisa realizada por Sobreiro et al., 2003 avaliando a relação entre qualidade dos produtos de origem animal comercializados no mercado varejista e o nível sócio-econômico do consumidor na cidade do Rio de Janeiro, constatou que as condições higiênico sanitárias dos mercados situados em áreas de nível sócio econômico inferior foram extremamente insatisfatórias e bastantes diferenciadas dos mercados situados em áreas de melhor nível sócio-econômico. Apesar das amostras coletadas e das análises bacteriológicas realizadas pelo autor supracitado não terem sido semelhante as realizadas nesta pesquisa, vale ressaltar que as análises bacteriológicas realizadas por Sobreiro e colaboradores, confirmou que existe diferença quanto à qualidade higiênico sanitária dos produtos oferecidos de acordo com o nível sócio econômico do consumidor, nos estabelecimentos pesquisados.

O presente trabalho comprovou, que existe diferença significativa do padrão de qualidade bacteriológica da carne bovina desossada em estabelecimento comercial localizado na periferia da cidade, quando comparado com o estabelecimento comercial localizado na área central da cidade, no que se refere à contaminação da carne bovina por *Salmonella* spp.

Apesar das normas, portarias e leis exigindo-se aplicação de boas práticas de fabricação em todas as etapas da cadeia produtiva da carne, a aplicação das mesmas diariamente, não é uma realidade brasileira, em especial em alguns municípios, que tem a prerrogativa legal de exercer a fiscalização dos estabelecimentos. O não cumprimento da legislação pode estar relacionado com a incapacidade numérica de funcionários em órgãos fiscalizadores, a deficiência estrutural e financeira das vigilâncias sanitárias e vigilâncias epidemiológicas, a não utilização adequada da legislação vigente, a sub-notificação dos surtos de ETA que dificultam o cumprimento da legislação na sua totalidade, cabendo aos órgãos fiscalizadores maior atuação, para que a atividade da vigilância sanitária e dos demais órgãos competentes se tornem uma realidade nacional.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e tendo em vista os objetivos iniciais do trabalho, as seguintes conclusões podem ser estabelecidas:

- Não existe diferença estatística significativa em relação à temperatura da carne bovina recebida nos estabelecimentos comerciais pesquisados.
- Não foi constatado diferença estatística significativa com relação aos valores de pH das meias carcaças bovinas analisadas, entre os estabelecimentos pesquisados.
- Não há diferença estatística significativa entre os estabelecimentos pesquisados, com relação ao nível de contaminação por coliformes termotolerantes, apesar do estabelecimento A ter demonstrado aumento do nível de contaminação após a desossa superior ao aumento demonstrado no estabelecimento B.
- Comprovou-se diferença estatística significativa com relação a presença de *Salmonella* spp no estabelecimento localizado na periferia da cidade (A), após o processo de desossa. Porém não houve diferença estatística significativa com relação ao mesmo patógeno no estabelecimento localizado na área central da cidade (B), tanto antes como depois da desossa.
- Foi verificado o baixo padrão de qualidade na recepção da carne bovina nas casas atacadistas, considerando que 37,50% das amostras analisadas apresentaram nível de contaminação para coliformes termotolerantes acima do estabelecido pelo USDA, 1996 e 12,50% das amostras apresentaram presença de *Salmonella*, tornando o produto, ora em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (USDA, 1996) e ora impróprio para o consumo (BRASIL, 2001).
- A alta freqüência de positividade para coliformes termotolerantes e *E. coli* bem como a presença de *Salmonella* spp indicam que o produto analisado (alcatra) na

sua maioria, foi obtido ou conservado de maneira imprópria, podendo representar um elo importante na cadeia de transmissão de ETA, comprometendo a saúde pública.

7 SUGESTÕES

De acordo com as observações expostas, sugere-se:

- Que sejam definidas oficialmente a enumeração de coliformes termotolerantes para a carne bovina *in natura*, devido o perigo á saúde pública da presença deste patógeno em alimento, assim como da sua função de indicador de condições higiênico-sanitárias.
- Que os estabelecimentos comerciais que realizam desossa, se adequem as exigências das portarias 304/96 e 145/97 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, obtendo o título de entreposto com desossa aprovada.
- Que a vigilância sanitária tenha uma atuação mais contundente com relação á fiscalização de estabelecimentos comerciais que recebem, manipulam, processam e comercializam produtos de origem animal em geral, em especial os produtos cárneos.
- Que os órgãos responsáveis pela fiscalização forneçam condições apropriadas para treinamentos regulares dos fiscais que atuam em tal área, bem como dos manipuladores de alimentos, para que os mesmos, prestem um serviço de melhor qualidade.
- Avaliação periódica de manipuladores que participam da desossa relativo a identificação de portadores assintomáticos de *Salmonella* spp.
- Exigência para transporte da carne sob refrigeração (com temperatura entre 0º C a 4º C) não importando a distância entre o frigorífico e o mercado varejista.
- Que a legislação nacional possibilite a fixação de padrões por área (cm²) em casos de amostragem não destrutiva, na análise microbiológica de produtos cárneos, visando o julgamento e destino adequado destes produtos, contribuindo para a preservação da saúde pública.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUT *E. coli*. Disponível em: <www.aboutecoli.com/foodsafety/o157:h7>. Acesso em 15 mai. 2003.

ALMEIDA, A. S.; GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. *Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moído. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 16, n. 96, p. 77-81, mai./2002.

ANDERSON, M. E. et al. Evaluation of a prototypr beef carcass washer in a commercial plant. *Journal of Food Protection*. v. 44, n. 1, p. 35-38, jan./1981.

_____. Evaluation of swab and tissue exccision methods for recovering microorganisms from washed and sanitized beef carcasses. *Journal of Food Protection*. v. 50, n. 9, p. 741-743, set./1987.

ANDREWS, W. H. et al. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.;ITO, K. *Compedium of Methods for the Microbiological Examination of foods*. 4. ed. Washington: APHA, 2001. 676 p. cap. 37, p. 357-380.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *International Official Method of Analysis*, 16 th ed.AOAC International. 1980. 1018 p.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical committee on microbiological methods for foods. *Compendium for the Microbiological Examination of Foods*, 3 ed., ed. C. Vanderzant e D.F. Splittstoesser, APHA, Washington, D.C., 1992. 1912 p.

_____. Technical committee on microbiological methods for foods. *Compendium for the Microbiological Examination of Foods*, 3 ed. C. Vanderzant e D.F. Splittstoesser, APHA, Washington, D.C., 2001. 676 p.

APPCC - Na qualidade e segurança de alimentos. Varela. São Paulo, 1997. 377 p.

ARCHER, D. L. *E. coli* O157:H7 – Searching for solutions. *Food Technology*. v. 54, p. 142, oct./2000.

ARTHUR, T. M. et al. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Applied and Environ. Microbiology*. 4847-4852 p, out./2002.

BAILEY, J. S.; COX, N. A. e BLANKENSHIP, L. C. A comparison of na enzyme immunoassay. DNA hidrolization, antibody immobilization, and conventional methods for recovery of naturally occurring *Salmonellae* from processed broiler carcasses. *Journal of Food Protection*. v. 54, p. 354-359, 1991.

BARRETO, N. S.; VEIRA, R. H. S. F. *Salmonella* versus manipuladores de alimentos: fator de risco para os consumidores. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 16, n. 101. p.15, out./2002.

BARROS, V. R. M.; PAVIA, P. C.; PANETTA, J. C. *Salmonella* spp: sua transmissão através dos alimentos. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 16, n. 94. p. 15-19, mai./2002.

BARTELS, H. et al. *Inspeção veterinária de la carne*. Medios auxiliares de diagnóstico en la inspección de carnes. Zaragoza: Acribia. 1971. 494 p. 395-410 p.

BORGES, J. T. S.; FREITAS A. S. Aplicação do sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. *Boletim de Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*. Curitiba: Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), v. 20, n. 1, jan./jun. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 304, de 22 de abril de 1996. Introduz modificações racionais e progressivas para que se alcancem avanços em termos higiênicos, sanitários e tecnológicos na distribuição e comercialização da carne bovina, bubalina e suína, visando principalmente à saúde do consumidor. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/dipoa/port304.html>>. Acesso em: 28 dez. 2003.

———. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 145, de 1º de setembro de 1998. Incrementar o programa de distribuição da carne bovina e bubalina, no comércio para distribuição e industrialização. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/dipoa/port145.html>>. acesso em 28 dez. 2003.

———. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos Analíticos Oficiais Para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes*. Métodos Físico e Químicos – carne bovina *in natura*. Brasília, 1981. Cap.1, p.2.

———. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária . Resolução – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprovava o regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, n.7, p.45-53, de 10 de janeiro de 2001. Seção 1.

———. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Secretaria de Inspeção de Produto Animal. Padronização de cortes da carne bovina. Brasília: MA/SNAD/SIPA. 98p. 1990.

_____. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de produtos de Origem Animal*. Aprovado pelo decreto 3091 de 29.01.1952, alterado pelo decreto 1255 de 25.06.1962. Brasília, 1997. 166p.

BRESSAN, M. C., et al. Os Alimentos de Origem Animal. *Textos Acadêmicos*. Lavras: UFLA. 5-65 p. 1999.

BRESSAN, M. C.; PEREZ, J. R. O. *Textos Acadêmicos: Tecnologia de carnes e pescados*. Lavras: UFLA. 240 p. 2001.

BUCHANAN, R. L.; DOYLE, M. P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technology*, v. 51, p. 69-76, oct. 1997.

CARVALHO, E.P. *Textos acadêmicos: Microbiologia de alimentos*. Lavras: UFLA. 128 p. 2001.

CDC – CENTER DISEASE CONTROL. Outbreaks of *Salmonella enteritidis* gastroenteritis – California: *MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report*. Oct./1993. Disponível: <<http://www.mmwr/outbreaks/salmonella/html>>. Acesso em: 21 dez. 2003.

CERQUEIRA, A. M. F.; TIBANA, A.; GUTH, B. E. C. High occurrence of shiga-like toxin production strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro city, Brasil. *Journal of Food Protection*. v. 60, n. 2, p. 177-180. 1997.

CHANDRAN, S. K., et al. Effect of slaughter-dressing, fabrication and storage conditions on the microbiological and sensory characteristics of vacuum-packaged beef steaks. *Journal of Food Science*. v. 51, n. 1, p. 37-39. 1986.

DAINTY, R. H.; MACKEY, B. M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *Journal Applied Bacteriological Symposium Supplement*, v. 73, n. 2, p.103–114, 1992.

D'AOUST, J. Y. *Salmonella* detection in foods: present status and research needs for the future. *Journal of Food Protection*, v. 47, n. 1, p. 78-81, 1984.

DBMD – Division of Bacterial and Mycotic Diseases. Salmonellosis – General Information. 2003. Disponível em: <<http://www.dbmd/salmonellosis/generalinformation.htm>>. Acesso em: 21 dez. 2003.

DICKSON, J. S.; ANDERSON, M. E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: A review. *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 2, p. 133-140, 1992.

DORSA. W. J.; CUTTER, C. N.; SIRAGUSA, G. R. Evaluation of six sampling methods for recovery of bacteria from beef carcass surfaces. *The society for applied bacteriology*. v. 22, p. 39-41. 1996.

EIROA, M. N. U. Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causado por alimentos processados. *Coletânea ITAL*, Campinas–SP, v. 19, n. 2, p. 101-102. Jul./dez. 1989.

FDA – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. *Bad Bug Book –Salmonella*.1996. Disponível em: ><http://www.badbugbook/fda/cfsan/salmonellaspp.html>> . Acesso em: 18 out. 2003.

FLISS, I.; SIMARD, R. E.; ETTRIKI, A. Comparison of three sampling techniques for microbiological analysis of meat surfaces. *Journal of Food Science*, v. 56, n. 1, p. 249-252. 1991a.

_____. Microbiological quality of differnt fresh meat species in Tunisian slaughterhouses and markets. *Journal of Food Science*, v.54, n.10, p. 773-777. 1991b.

FORREST, J. C et al. *Fundamentos de ciência de la carne*. 1. ed. Ed. Zaragoza: Acribia. 1979. 417 p.

FORTUNA, J. L. Aspectos higiênico-sanitários no preparo de carne bovina, no estado do Rio de Janeiro. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 16, n. 95, p. 23-33, abr./2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. 182 p.

FRANCO, R. M. *Escherichia coli: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana*. Niterói/RJ, 2002. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2002.

FSIS. Food Safety and Inspection Service. *Strategic Plan 1997-2002*. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/ao/safety.html>>. Acesso em:12 abr. 2004.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Agentes bacterianos de toxinfecções alimentares. In: *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Ed. Varela, 2001. 629 p. Parte 12, p. 199-258.

GERMANO, M. I. S, et al. Manipuladores de Alimentos. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 14, n. 78, p. 24, nov./dez. 2000.

GILL, C. O. Cold storage temperature fluctuations and predefcting microbial growth. *Journal of Food Protection*, v. 55, n. 2, p. 43-47, jun. 1996a.

_____. Extending the Storage Life of Raw Chilled Meats. *Meat Science*. v. 43, 99-109 p. 1996b.

GILL, C. O.; NEWTON, K. G. The ecology of bacterial spoilage of fresh meat at chill temperatures. *Meat Science*. v. 2, n. 3, p. 207-217, 1982.

GIOMBELLI, A.; SILVA, N. L. Avaliação do método tradicional para detecção de *Salmonella* spp. em carnes *in natura*. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 15, n. 87, p. 63-66, ago. 2001.

GLEDEL, J. Las salmonelas. In: BOURGEOIS, C. M.; MESCLA, J. F.; ZUCCA, J. *Microbiología alimentaria*. Espanha: Acribia, 1994. 676 p. cap. 1, p. 53-66.

GUNVINS, M.; BOGH, S. Time-temperature in distribution of chilled meat and poultry. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY. 1989. Copenhagen. *Anais*. vol. II, n. 37, p. 459-464.

HAJDENWURCEL, J. R. *Atlas de Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Fonte comunicações e editora, 1998. 66 p.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. *Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos*. 6º ed. São Paulo: Varela, 1999. 377 p.

HOLT, J. G et al. Facultatively anaerobic Gram negative. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 th. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p. Group 5, p. 175-197.

IBGE. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*, Brasil: 2002. Disponível em: <<http://www.ibge.org.br>> . Acesso em: 22 fev. 2003.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Microbial ecology of foods factors affecting life and death of microrganisms*. Academic Press: London, 1980. v. 1. 332 p.

_____. *Microbial ecology of foods factors affecting life and death of microrganisms*. Academic Press: London, 1997. v. 1. 332 p.

JAKABI, M. J. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp. ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Revista Instituto Adolf Lutz*, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

JAKABI, M.; FRANCO, B. D. G. M. Freqüência de cepas de *Escherichia coli* patogênica em alimentos de origem animal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 11, n. 2, p. 170-181. 1991.

JAMES, S. The chill chain "from carcass to consumer". *Meat Science*. v. 43, 203-216 p. 1996.

JAY, J. M. *Microbiologia Moderna de los Alimentos*. 3 ed., Zaragoza: Acribia, 1994. 1094 p.

KAKU, M. et al. Surto alimentar por *Salmonella enteritidis* no Noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 29, n. 2, abr./1995.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods*. 4 ed. Washington: APHA, 2001. 676 p. cap. 8, p. 69-82.

LASTA, J. A. et al. Bacterial count from bovine carcasses as an indicator of hygiene at slaughtering places: A proposal for sampling. *Journal of food protection*, v. 54, n. 4, p. 271-278, 1992.

LÁZARO, N. S. *Caracterização de sorovares de Salmonella em suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro e no ambiente de abatedouros*. Rio de Janeiro, 1999. Tese (Doutorado em Ciências Microbiológicas) Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1999.

LAWRIE, R. A. *Meat Science*. 3 th. Oxford. 1979. 451 p.

LEITÃO, M. F. Aspectos microbiológicos das carnes. cap.1 1-5p. In: CONTRERAS, C.J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K.M.V.A. B.; MIYAGUSKU, L. *Higiene e Sanitização na Indústria de Carnes e Derivados*. 181 p. São Paulo: 2003.

LE MINOR, L. Genus III – *Salmonella*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. 8th. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 964 p. v. 1, p. 427-458.

LE MINOR, L.; POPOFF, M.Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 37, n. 04. p. 465-468, oct. 1987.

LE MINOR, L.; VERON, M.; POPOFF, M.Y. Proposition pour une nomenclature des "*Salmonella*". *Ann. Microbiol.* (Inst. Pasteur) n.133. p. 245-254, 1982.

LIMA, S. A. Comercialização da carne no Estado do Ceará e a vigência da portaria 304/96. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 12, n. 53, p. 58-61, jan./fev. 1998.

LÍRIO, S. V., et al. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 12, n. 55, p. 36-41, mai. 1998.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods*. 4 ed. Washington APHA, 2001. 676 p. cap. 35, p. 331-341.

MERCK. *Manual de cultivo*. Darmstadt, Alemanha: 364 p., 1994.

MOTARJEMI, Y., et al. Food Safety Issues. *Food technologies and public health*. World Health Organization. 1995. 23 p.

NATARO, J. P.; KAPPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *American Society for Microbiology*. Baltimore. v. II, n. 1, p.142-201, jan. 1998.

NEVES FILHO, L. C. A cadeia do frio: uma abordagem técnica. *Anais do 1º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes*. São Pedro/SP. 2001.

_____. Estocagem e distribuição frigorificadas. *Revista Nacional da Carne*. n. 179, p. 14-26. 1992.

NORTJÉ, G. L.; NAUDÉ, T. Microbiology of beef carcass surfaces. *Journal of Food Protection*, v. 44, n. 5, p. 355-358, 1981.

NOTTINGHAM, P. M. Microbiology of carcass meats. In: BROWN, M. H. *Meat microbiology*, London: Applied Science, 1982. p.13-65.

OLIVEIRA, N. M. S.; NASCIMENTO, L. C. ; FIORINI, J. E. Isolamento e identificação de bactérias mesófilas em carnes frescas bovinas e suínas. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 16, n. 94, p. 68, mar. 2002.

OMS – Organização Mundial de Saúde. *Weekly Epidemiological Record*. Geneva. n. 14. 105-112.p. abr./1999. Disponível em: <<http://www.who.int/wer>>. Acesso em: 23 jan. 2004.

ORSKOV, F. Genus I. *Escherichia coli*. CASTELLANI AND CHALMERS 1919. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. 8th. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. 964 p. v. 1, p. 420-423.

PANTING, P. V. B. *Avaliação morfológica da carne bovina mantida sob refrigeração comercializada em Niterói-RJ: Correlação com provas físico-químicas*. 1998. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Niterói: RJ. 1998.

PARDI, M. C.; et al. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*. v I. Ciência e Higiene da Carne. Tecnologia da sua obtenção e Transformação. Universidade Federal Fluminense. EDUFF- Editora Universitária, 2001. 623 p.

PERESI, J. T. M., et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella enteritidis*. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo. v. 32, n. 5, out. 1998.

PETRI, C. M.; ANTUNES, L. A. F.; SARIDAKIS, H. O. *Escherichia coli* em produtos cárneos comercializados em Londrina. Frequência de *Escherichia coli* Enteropatogênica Clássica (EPEC). *Revista de Microbiologia*. São Paulo. v. 20, n. 4, p. 421-426, out./dez.1989.

PINTO, P. S. Aspectos sanitários da salmonelose como uma zoonose. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 14, n. 73. p. 39-43, jun. 2000.

PRICE, J. F.; SCHWEIRGERT, B. S. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1994. 581 p.

PROBAC DO BRASIL. *Produtos Bacteriológicos Ltda*. Meios para identificação de enteropatógenos. Soros para identificação bacteriana. São Paulo. Brasil, 1998.

ROÇA, R. O. *Textos acadêmicos: Refrigeração*. Botucatu – SP. 2000.

ROSSET, R. Refrigeration y congelación. In: BOURGEOIS, C. M.; MESCLA, J. F.; ZUCCA, J. *Microbiología alimentaria*. Espanha: Acribia, 1994. 676 p. cap. 1, p. 385-409.

SCHULLER, L. As moscas domésticas e sua importância na transmissão de intoxicações e infecções alimentares. *Revista Higiene Alimentar*. São Paulo. v. 14, n. 73. p. 28, jun./2000.

SCHULZE, J. C. M. Tratamento químico de carcaças de aves, suínos e bovinos. In: CONTRERAS, C. J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K.M.V.A. B.; MIYAGUSKU, L. *Higiene e Sanitização na Indústria de Carnes e Derivados*. p. 173-181. São Paulo: Varela, 2003. 181 p.

SECOM/MT – Secretaria de Comércio de Mato-Grosso. *MT é 1º lugar na criação de gado e produção de carne bovina*. Disponível em: <<http://www.secommt.gov.br>>. Acesso em: 03 fev. 2004.

SILLIKER, J. H.; GABIS, D. A. *Salmonella*. In PEARSON, A. M.; DUTSON, T. R. *Advances in Meat Research: Meat and Poultry Microbiology*. Michigan, 1986. 436 p. v. 2, cap. 7, 209-229 p.

SILVA, A. M. Avaliação do estado de conservação de carnes bovinas, a nível de consumo. *Arquivo Fluminense de Medicina Veterinária*. v. 3, n. 1. p. 26, 1988.

SILVA, J. A.; BERAQUET, N. J. A microbiota contaminante da carcaça bovina. *Boletim SBCTA*. v. 2, n. 32, p.157-166, set./dez. 1998.

SILVA, J. A. *Tópicos da Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Varela, 2000. 227 p.

SILVA Jr, E. A. *Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos*. São Paulo: Varela, 2002. 479 p.

SOBREIRO, L. G., et al. Relação entre a qualidade dos produtos de origem animal comercializados no mercado varejista e o nível sócio-econômico do consumidor. In: I CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS; VII CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS. 2003, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Alimento Saudável: Fonte de vida, 2003.

STROHL, W. A. et al. *Microbiologia Ilustrada*. São Paulo: Ed. Artmed S.A, 2004. 316 p.

SWATLAND, H. J. *Estructura y desarrollo de animales de abasto*. Espanha: Ed. Acribia, 1984. 443 p.

THORNTON, H. *Compêndio de inspeção de carnes*. 5º ed. Londres: Bailliére. 1969, 665 p.

TOLEDO, M. R. F. *Salmonella – Shigella*. In: TRABULSI, L. R. TOLEDO, M. R. F. *Microbiologia*. 2 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1998. 386 p. cap. 27, p. 157-160.

TOLEDO, M. R. F.; FONTES, C. F.; TRABULSI, L. R. EPM modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. *Revista de microbiologia*, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 309-315, out./dez.1982.

TOMPKIN, R. B.; McNAMARA, A. M.; ACUFF, G. R. Meat and Poultry Products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of foods*. 4 ed. Washington APHA, 2001. 676 p. cap. 45, p. 463-471.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. *Escherichia*. In: _____. *Microbiologia*. 2 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1998. 386 p. cap. 26, p. 149-155.

USDA. Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems. Final Rule. *Federal Register*. Part II, v. 61, n. 144. 1996. Disponível em: <<http://www.fsis.usda.gov/oa/haccp/rule>>. Acesso em: 14 abr. 2004.

VALLE, E. R. *Carne bovina: alimento nobre e indispensável*. 2000. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/gadodecorte/carne>>. Acesso em 18 mar. 2002.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. *Foodborne pathogens. An illustrated text*. Marison Publishing, 1996. 501 p.

VERAS, J. F.; BLUM, E.; SILVA, T. J. P. Avaliação da temperatura, do pH e da maciez das carnes bovinas comercializadas em açougues e supermercados do grande Rio de Janeiro. *Anais do 1º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes*. São Pedro/SP. 2001.

9 OBRAS CONSULTADAS

ABREU, E. S.; TEIXEIRA, J. C. A. *Apresentação de trabalhos monográficos de conclusão de curso*. 6º ed. Niterói: EdUFF, 2003. 85 p.

BIER, O. Bactérias Intestinais. In: *Microbiologia e imunologia*. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1234 p. cap. 23. 609-650 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. Coordenação de Laboratório Animal. *Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos*. Brasília, 2000.

COSTA, G. A.; HOFER, E. Isolamento e identificação de enterobactérias. *Instituto Oswaldo Cruz*. 120 p.

FADDIN, J. F. M. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Buenos Aires: Panamericana. 1985. 286 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela, 1997. 295 p.

SIQUEIRA, R. S. *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasília. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos. 1995. 159 p.

10 ANEXOS

Quadro 01: Número mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes e intervalo de confiança de 95% de probabilidade, para combinação de tubos positivos em séries de três.

0,1	0,01	0,001	NMP/g	
0	0	0	<3	
0	0	1	3	
0	0	2	6	
0	0	3	9	
0	1	0	3	
0	1	1	6.1	AOAC
0	1	2	9.2	AOAC
0	1	3	12	
0	2	0	6.2	
0	2	1	9.3	
0	2	2	12	
0	2	3	16	
0	3	0	9.4	AOAC
0	3	1	13	
0	3	2	16	
0	3	3	19	
1	0	0	4	AOAC 3.6
1	0	1	7	AOAC 7.2
1	0	2	11	
1	0	3	15	
1	1	0	7	AOAC 7.3
1	1	1	11	
1	1	2	15	
1	1	3	19	
2	0	0	9	AOAC 9.1
2	0	1	14	
2	0	2	20	
2	0	3	26	
2	1	0	15	
2	1	1	20	
2	1	2	27	
2	1	3	24	
2	2	0	21	
2	2	1	28	
2	2	2	35	
2	2	3	42	
2	3	0	29	
2	3	1	36	
2	3	2	44	
2	3	3	53	
3	0	0	23	

CONTINUA

CONTINUAÇÃO

3	0	1	39
3	0	2	64
3	0	3	95
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	1	3	160
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	2	3	290
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>1100

Fonte: AOAC (1980); APHA (1992); APHA (2001).

11 APÊNDICE

Quadro 2: Resultados da determinação da temperatura das meias carcaças bovinas nos estabelecimentos varejistas A e B analisados.

	Estabelecimento A	Estabelecimento B
Amostra 01	6,7	5,1
Amostra 02	6,8	4,1
Amostra 03	6,4	5,5
Amostra 04	6,6	7
Amostra 05	4,7	7
Amostra 06	4,1	6,6
Amostra 07	4,4	7,5
Amostra 08	5,5	7,7
Amostra 09	4,1	6,3
Amostra 10	14,5	6,9
Amostra 11	13,5	11,2
Amostra 12	14,3	12,6
Amostra 13	13,5	12,9
Amostra 14	14,5	10,2
Amostra 15	11,3	11,6
Amostra 16	10,9	12,8
Amostra 17	10,1	12,5
Amostra 18	11,1	11
Amostra 19	11,2	11,9
Amostra 20	15,6	12,9
Amostra 21	14,3	9,1
Amostra 22	13,2	10
Amostra 23	13,6	9,4
Amostra 24	13,8	10,3
Amostra 25	13,6	9,9
Amostra 26	7	9,7
Amostra 27	6,2	6,7
Amostra 28	9,3	4,8
Amostra 29	6	5,6
Amostra 30	6,8	6,1
Amostra 31	8,8	10,5
Amostra 32	10,1	10
Amostra 33	9,5	11,5
Amostra 34	9,2	12,4
Amostra 35	8,6	13
Amostra 36	4,9	10,3
Amostra 37	7,5	10,9
Amostra 38	5,5	10
Amostra 39	10,6	11,4
Amostra 40	11,7	11,9

QUADRO 3: Resultado da determinação de pH do músculo *tensor fáscia latae* nos estabelecimentos varejistas A e B.

	Estabelecimento A	Estabelecimento B
Amostra 01	5,46	6,53
Amostra 02	6,12	6,38
Amostra 03	5,8	6,45
Amostra 04	6,22	5,97
Amostra 05	5,75	5,92
Amostra 06	5,77	5,93
Amostra 07	5,55	5,84
Amostra 08	5,7	6,55
Amostra 09	6,27	5,85
Amostra 10	5,55	6,26
Amostra 11	5,65	5,7
Amostra 12	5,6	5,9
Amostra 13	5,68	5,68
Amostra 14	5,97	5,71
Amostra 15	5,66	5,79
Amostra 16	5,68	5,63
Amostra 17	5,57	5,8
Amostra 18	5,69	6,15
Amostra 19	5,72	5,51
Amostra 20	5,67	5,69
Amostra 21	5,78	5,96
Amostra 22	5,73	6,21
Amostra 23	5,75	5,9
Amostra 24	5,63	5,8
Amostra 25	5,67	5,66
Amostra 26	6,18	6,14
Amostra 27	5,87	6,35
Amostra 28	5,88	5,88
Amostra 29	5,83	6,05
Amostra 30	5,88	5,67
Amostra 31	5,66	5,69
Amostra 32	5,64	5,83
Amostra 33	5,6	6,24
Amostra 34	5,78	5,66
Amostra 35	5,5	6,27
Amostra 36	5,58	5,92
Amostra 37	5,67	6,28
Amostra 38	5,8	6,15
Amostra 39	5,65	6,03
Amostra 40	5,78	6,29