

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO HIGIENE VETERINÁRIA E
PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE P.O.A.

VIVIANE BRANDÃO BARREIRA

ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DA CARNE DE RÃ-TOURO
(*Lithobates catesbeianus*) COMERCIALIZADA NO
MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, ESTADO DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI
2009

VIVIANE BRANDÃO BARREIRA

**ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DA CARNE DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)
COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, ESTADO DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana de Fátima Marques de Mesquita

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Maia Franco

Co-orientadora: Dr^a. Silvia Conceição Reis Pereira Mello

Niterói
2009

VIVIANE BRANDÃO BARREIRA

ANÁLISE BACTERIOLÓGICA DA CARNE DE RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)
COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, ESTADO DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre. Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Eliana de Fátima Marques de Mesquita
UFF

Prof. Dr. Robson Maia Franco
UFF

Prof. Dr. José Teixeira de Seixas Filho
FIPERJ

Prof. Dr. Zander Barreto Miranda
UFF

Dr^a. Silvia Conceição Reis Pereira Mello
UNISUAM

Niterói
2009

Dedico esse trabalho à minha
família, meu eterno alicerce de
amor, compreensão e paz.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me permitiu concluir mais uma etapa.

À minha mãe Itaci Nísia Nogueira Brandão por todo amor, amizade, compreensão e ensinamentos valiosos.

Ao meu pai Orlando Barreira por todo amor e amizade.

Ao meu noivo Daniel Freire Cordeiro por todo amor e paciência nos momentos de ausência.

À minha tia-avó Nyzia Faria Nogueira meu eterno amor e gratidão por seus ensinamentos e agradável presença.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Eliana de Fátima Marques de Mesquita pela amizade, dedicação, paciência, auxílio e ensinamentos indispensáveis à realização deste trabalho.

À minha co-orientadora Dr^a. Silvia Conceição Reis Pereira Mello pela amizade e colaboração nos conhecimentos específicos que me despertou ainda mais o interesse pela ranicultura.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Robson Maia Franco que possui grandioso saber em microbiologia e com muita paciência, dedicação, solidariedade e alegria me ajudou imensamente.

Ao Prof. Dr. Zander Barreto Miranda pelo apoio e filosofias de vida.

Ao Prof. Dr. José Teixeira de Seixas Filho por compor a banca examinadora no último momento, enriquecendo meus conhecimentos e a minha dissertação.

Ao Prof. Dr. Rodolpho de Almeida Torres Filho pelo auxílio estatístico.

Ao Prof. Dr. Raul Ribeiro de Carvalho pela sabedoria e irreverência sempre bem-vindas.

Ao Prof. Dr. Renato Clapp do Rego Barros pela amizade e seu espírito pacificador que muito me agrada.

À amiga Verônica Barreto Novais pela ajuda na correção do “abstract”.

À amiga Flávia Aline Andrade Calixto pela câmera fotográfica emprestada e pelos momentos de alegrias, apoio e compreensão.

Aos meus familiares e amigos pela eterna torcida.

Aos meus colegas da UFF pela solidariedade em todos os momentos do mestrado: Sue Yoshii Fernández, Carla da Silva, Luciana da Silva e Rocha, Ivone Costa Soares, Ana Paula Neves Martins, Raquel Gouvêa, Vanessa Pereira Rangel, Priscila Albuquerque Andreoli, Rita de Cássia Figueira Silva, Neila Mello dos Santos Cortez, Marcos Aronovich e Marta Maria Braga Baptista Soares Xavier.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte da elaboração desta dissertação.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... E a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

RESUMO

A carne de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) possui elevado teor protéico; bom índice de digestibilidade; todos os aminoácidos essenciais; baixo teor de lipídios, de sódio e de calorias; todos os ácidos graxos essenciais e paladar suave, sendo recomendada especialmente para crianças e convalescentes. Deve ser proveniente de criadouros e abatedouros comerciais autorizados e regulamentados por normas de qualidade. Em 2007, a Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde divulgou boletim referente aos anos de 1999 a 2007 onde houve decréscimo no número de doentes e surtos causados por doenças de origem alimentar. Porém, a maior incidência foi na faixa etária de menos um a nove anos e os agentes etiológicos mais isolados foram as bactérias: *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Bacillus cereus*, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi pesquisar bactéria do gênero *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva e o Número Mais Provável de Coliformes Totais (CT) e Fecais (CF) em 30 carcaças de rã-touro de três diferentes marcas, congeladas, embaladas e inspecionadas no comércio varejista do município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, Brasil. As amostras congeladas foram transportadas ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, em embalagem original, transportadas em bolsa térmica e posteriormente acondicionadas no freezer a – 18°C. As amostras descongeladas em geladeira por “overnight” foram imediatamente analisadas pela metodologia preconizada pela Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Os resultados indicaram positividade para *Salmonella* spp. em três amostras, correspondendo a 10% do total; 30% das amostras apresentaram ausência de CT, enquanto 93,33% apresentaram ausência de CF e o percentual de amostras impróprias para consumo, segundo a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi de 53,33%. Conclui-se que há contaminação nas carnes de rã e os resultados servem de alerta para os órgãos competentes de fiscalização, as indústrias e os consumidores, pois a presença destas bactérias no alimento indicam inadequadas condições higiênico-sanitárias da indústria e/ou estocagem, perda de qualidade do alimento e risco de toxinfecção alimentar, portanto, perigo à Saúde Coletiva.

Palavras-chave: rã-touro; carne de rã; contaminação; segurança dos alimentos.

ABSTRACT

The bullfrog meat (*Lithobates catesbeianus*) has a high protein content; a good digestibility index; contains all essential amino acids; low level of lipids, sodium and calories; contains all essential fatty acids and a smooth mouth feel, being recommended especially for children and convalescent individuals. The bullfrog meat must be acquired in commercial vivarium and slaughterhouses authorized and regulated by quality standards. In 2007, the “Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde” published reports dated from 1999 to 2007 mentioning a decrease in illnesses and epidemic events caused by food diseases. However, children from one to nine years old were the most affected and the major etiological agents isolated were the following bacteria: *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. and *Bacillus cereus*, respectively. The main purpose of this study was to research the coagulase-positive *Staphylococcus* count, *Salmonella* spp. and the most probable number of Total Coliforms (TC) and Fecal Coliforms (FC) in 30 frozen bullfrogs carcasses from retail market of Rio de Janeiro District, State of Rio de Janeiro, Brazil. The frozen samples were transported to the “Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal”, of the “Faculdade de Veterinária” (“Universidade Federal Fluminense”), in their original packaging, within thermal pouches and then stowed in a freezer at – 18°C. The specimens defrosted in a refrigerator by “overnight” were immediately analyzed in compliance with the Normative Ruling # 62 (August/26/2003) of “Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento”. The results were positive for *Salmonella* spp. in three samples, corresponding to 10% of the total samples; 30% of the samples did not indicate TC presence, while 93,33% showed no trace of FC and the inappropriate percentage of samples for consumption, according to the coagulase-positive *Staphylococcus* count, was 53,33%. Thus, the conclusion is that there is a contamination in frog meat and the results must represent an alert for the responsible inspection sectors, industries and consumers, because the food bacteria indicate inappropriate sanitary conditions of industry and/or storage methods, food quality loss and food poisoning hazard, therefore, determining a Collective Health hazard.

Keywords: raniculture; frog meat; contamination; food safety.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação do ciclo de vida das rãs, f. 21
- Figura 2** Ilustração da cadeia produtiva da ranicultura, f. 26
- Figura 3** Fluxograma tradicional do abate de rãs, f. 28
- Figura 4** Representação da amostra adquirida para análise, f. 51

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 Principais diferenças morfológicas entre macho e fêmea de rã-touro, f. 21

Quadro 2 Produção brasileira e mundial de carne de rã (t) no período de 1988 a 2001, f. 23

Quadro 3 Composição química de diferentes tipos de carne (amostra de 100 g), f. 31

Quadro 4 Composição centesimal da carne de rã-touro, f. 32

Tabela 1 Relação dos itens obrigatórios na rotulagem de acordo com a legislação brasileira, f. 67

Tabela 2 Positividade para *Salmonella* spp., f. 68

Tabela 3 Número e percentual de amostras aptas para consumo segundo contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, f. 70

Tabela 4 Número e percentual de amostras com Coliformes Totais, f. 71

Tabela 5 Número e percentual de amostras com Coliformes Fecais, f. 72

Tabela 6 Resultado das análises bacteriológicas em carne de rã-touro congelada, comercializada no município do Rio de Janeiro, f. 73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABP	Ágar Baird-Parker
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT	Água Peptonada 1% Tamponada
BHI	“Brain Heart Infusion” ou Meio Infusão Cérebro Coração
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPLS	“Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar” ou Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
°C	Grau Celsius
Caldo EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
cm	Centímetro
CNPJ	Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica
CF	Coliforme Fecal (ou Termotolerante)
CLS	Caldo Lauril Sulfato
CO₂	Gás Carbônico
CRV	Caldo Rappaport Vassiliadis
CSC	Caldo Selenito-Cistina
CT	Coliforme Total
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
Dr.	Doutor
Dr^a.	Doutora
EaggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva

EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
et al.	<i>Et alia</i> (em latim, que significa entre outros)
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos da América
f	Folha
FAO	“Food and Agricultural Organization”
g	Gramma
H₂S	Ácido sulfídrico
HEK	Ágar Entérico Hektoen
IN	Instrução Normativa
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IUCN	“International Union for Conservation of Nature”
kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
L	Litro
LIA	“Lisine Iron Agar” ou Ágar Lisina Ferro
Log	Logaritmo
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mm	Milímetro
nº	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NH₃	Amoníaco
NMP	Número Mais Provável
NO₃	Nitrato
NO₂	Nitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
Prof.	Professor
Prof^a.	Professora
®	Marca Registrada
RAM	Ágar <i>Salmonella</i> Diferencial
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
RJ	Rio de Janeiro
RNA	“Ribonucleic Acid” ou Ácido Ribonucléico
R\$	Reais
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SIE	Serviço de Inspeção Estadual
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Ágar Sulfeto Indol Motilidade
SP	São Paulo
SSP	Solução Salina Peptonada
t	Tonelada
TSI	“Triple Sugar Iron” ou Ágar Três Açúcares e Ferro
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFF	Universidade Federal Fluminense
VBBL	Caldo Verde Brilhante Bile Lactose
/g	Por grama
/L	Por litro
/kg	Por quilograma
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO**, f. 16

2 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, f. 18

2.1 **RÃ-TOURO** (*Lithobates catesbeianus*), f. 18

2.1.1 **Taxonomia**, f. 18

2.1.2 **Distribuição geográfica e biologia**, f. 19

2.1.3 **Ranicultura**, f. 22

2.1.3.1 **Aspectos gerais**, f. 22

2.1.3.2 **A produção**, f. 24

2.1.3.3 **Abate e processamento**, f. 27

2.1.3.4 **Comercialização**, f. 28

2.1.4 **Características da carne de rã**, f. 30

2.2 **FATORES RELACIONADOS AOS ALIMENTOS SEGUROS**, f. 32

2.2.1 **Carne de rã versus alimentos seguros**, f. 34

2.2.2 **Congelamento da carne**, f. 35

2.3 **MICRO-ORGANISMOS ENVOLVIDOS**, f. 37

2.3.1 ***Salmonella* spp.**, f. 37

2.3.2 ***Staphylococcus Coagulase Positiva***, f. 42

2.3.3 **Coliformes**, f. 45

3 **MATERIAL E MÉTODOS**, f. 49

3.1 **CONSIDERAÇÕES GERAIS**, f. 49

3.2 **MATERIAL**, f. 49

3.2.1 **Amostras**, f. 49

3.3 **MÉTODOS**, f. 49

3.3.1 Controle de qualidade dos meios de cultura, f. 49

3.3.2 Análise estatística, f. 50

3.3.3 Obtenção e preparo das subamostras em laboratório, f. 50

3.3.4 Análises Bacteriológicas, f. 51

3.3.4.1 Enumeração de Coliformes Totais e Fecais, f. 52

3.3.4.1.1 *Esquema da enumeração de Coliformes Totais e Fecais, f. 54*

3.3.4.2 Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, f. 55

3.3.4.2.1 *Esquema da contagem de Staphylococcus Coagulase Positiva, f. 58*

3.3.4.3 Pesquisa de *Salmonella* spp., f. 59

3.3.4.3.1 *Esquema da pesquisa de Salmonella spp., f. 65*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, f. 66

4.1 FORMA DE APRESENTAÇÃO DA CARNE DE RÃ, f. 66

4.2 FREQUÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DA CARNE DE RÃ, f. 68

5 CONCLUSÕES, f. 75

6 SUGESTÕES, f. 76

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, f. 78

1 INTRODUÇÃO

As doenças de origem alimentar são um problema de Saúde Coletiva e afetam a produtividade econômica de uma região ou país. Anualmente, milhões de pessoas em todo o mundo, particularmente crianças e pessoas imunocomprometidas, sofrem e morrem por essas doenças. Entretanto, muitos agravos e mortes poderiam ser prevenidos se os manipuladores de alimentos fossem educados e monitorados de forma mais rigorosa e os consumidores mais informados nas escolhas dos alimentos que compram.

A magnitude e as consequências das doenças de origem alimentar são subestimadas frequentemente pelas autoridades em Saúde Coletiva. Foi necessário ocorrer alguns surtos e mortes para que houvesse uma maior consciência das autoridades para a problemática. A incidência varia de acordo com diversos aspectos: educação, condições sócio-econômicas, saneamento, fatores ambientais, culturais e outros, mas de um modo geral a distribuição geográfica é universal.

Os indivíduos contraem as doenças de origem alimentar quando ingerem alimentos contaminados com micro-organismos ou toxinas indesejáveis. Mas pelo fato de muitos patógenos causarem sintomas brandos; alguns enfermos se automedicarem; ou por não ser investigada a causa, a maioria dos casos são subnotificados pelos órgãos responsáveis por esse controle. Consequentemente o perfil epidemiológico das doenças de origem alimentar no Brasil é pouco conhecido, somente alguns estados e, ou, municípios dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes.

Os dados disponíveis de surtos apontam como agentes etiológicos mais frequentes os de origem bacteriana e dentre os quais, *Salmonella* spp., *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*. Entretanto, a sobrevivência e multiplicação do agente etiológico nos alimentos dependem dos mecanismos de defesa e das condições do meio, expressas principalmente pelos níveis de oxigenação, pH e temperatura, variável de acordo com cada alimento.

Nesse contexto, as carnes estão entre os alimentos comumente envolvidos nos surtos de origem alimentar, assim como a carne de rã - que é um alimento de grande valor nutritivo, paladar suave e alta digestibilidade - que deve receber cuidados higiênico-sanitários desde a criação até a mesa do consumidor.

A carne de rã está sujeita a várias fontes de contaminação ao longo da cadeia de produção e por isso medidas preventivas são necessárias. Como ferramentas fundamentais para o crescente desenvolvimento da ranicultura, tanto na produção animal, como nos setores industrial e comercial, é recomendada a adoção das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

A microbiota qualitativa e, ou quantitativa presente nos alimentos de origem animal, principalmente na carne de rã, deve ser a mais baixa possível tendo em vista as características e especificidades da espécie, tornando este alimento nobre em forma alternativa medicinal, podendo desta forma atender às necessidades das diferentes categorias de ingestores que apresentam quadros nosológicos.

Objetivou-se neste trabalho confrontar a melhor combinação entre os meios de enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo diferencial e confirmação presuntiva para *Salmonella* spp. Enumerar Coliformes Totais, Coliformes Fecais; contar e identificar *Staphylococcus* Coagulase Positiva e pesquisar *Salmonella* spp. em carne de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) congelada, comercializada no município do Rio de Janeiro, em função da necessidade de avaliação do perfil bacteriológico de amostras desse alimento e em conformidade com os achados, alertar e sensibilizar órgãos fiscalizadores quanto a importância da salubridade em nível comercial.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RÃ-TOURO (*Lithobates catesbeianus*)

2.1.1 Taxonomia

Reino ANIMALIA → são animais, seres vivos multicelulares;

Filo CHORDATA → possuem notocorda;

Subfilo VERTEBRATA → possuem vértebras;

Grupo GNATOSTOMATA → possuem mandíbula;

Superclasse TETRAPODA → possuem quatro membros locomotores;

Classe AMPHIBIA → possuem duas fases distintas na vida: aquática e terrestre;

Superordem SALIENTIA → são lentas;

Ordem Anura → não possuem cauda na fase adulta;

Família Ranidae → possuem membranas interdigitais nas patas traseiras;

Gênero *Lithobates*

Espécie *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802)

Nome popular: Rã-Touro

(BRUENING, 2002; IFSC, 2007; IHDCA, 2007; TEIXEIRA, 2001).

A comunicação entre os diversos campos da ciência biológica se dá principalmente pelo nome científico das espécies estudadas. Sem um nome científico universal, ditado segundo regras aceitas por toda a comunidade científica, que caracteriza cada espécie estudada e catalogada, ficaria difícil a comunicação entre os diversos campos da biologia. Quem dita tais regras é o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, que rejeita nomes que possam causar confusão ou ambiguidade, o que garante a universalidade dos nomes científicos, fazendo com

que estes sejam reconhecidos por cientistas de qualquer nacionalidade (BERNARDI, 1958).

Nesse contexto é importante alertar quanto à recente mudança do nome científico da rã-touro, de *Rana catesbeiana* para *Lithobates catesbeianus*, divulgado pelo Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental (IHDCA, 2007).

A espécie *Lithobates catesbeianus* é popularmente conhecida como rã-touro porque o macho na época da reprodução emite um som potente, o coaxar, muito parecido com mugido de touro (BRUENING, 2002; IFSC, 2007).

2.1.2 Distribuição geográfica e biologia

Os anfíbios são elementos importantíssimos nas cadeias e teias ecológicas, principalmente como controladores de insetos e outros invertebrados, sendo ora presas, ora predadores. No geral, são bons indicadores biológicos e ambientais, já que necessitam do ecossistema equilibrado para manterem sua diversidade. No entanto, na atualidade, esta classe é alvo de biopirataria, uma vez que na sua pele encontram-se compostos químicos de interesse das grandes indústrias farmacêuticas, com poderes curativos, analgésicos ou até mesmo anticancerígenos (FERREIRA et al., 2002).

Em termos ecológicos, os anfíbios, como animais ectotérmicos, que dependem de fontes externas de calor para manutenção da temperatura corpórea, são importantes no fluxo de energia do ambiente porque convertem cerca de 90% do que consomem em massa, dessa forma a temperatura e o metabolismo dos anfíbios variam com a temperatura do ambiente (ibid.). Diferentemente dos seres endotérmicos que possuem mecanismos internos para o controle da temperatura corpórea e, portanto, devem reservar parte da energia ingerida para manter a temperatura corpórea constante. Através desse mecanismo os anfíbios apresentam taxas de crescimento muito elevadas quando a temperatura ambiental é favorável (BASTOS et al., 2003).

Segundo Bastos et al. (2003), por serem de fácil observação, suportarem a presença do ser humano e permitirem manipulações, os anfíbios têm sido utilizados pela humanidade de diversas maneiras. Em várias partes do mundo as rãs são

iguarias bastante apreciadas. A rã-touro é criada para fins alimentares e científicos e o Brasil se destaca como produtor de carne e pele de rã.

Deve-se ter controle rígido sobre os criadouros para evitar que a rã-touro cause problemas à fauna nativa caso indivíduos adultos escapem acidentalmente e se reproduzam na natureza, podendo causar grande impacto ambiental sendo uma espécie invasora que, geralmente, não apresenta predador natural (ibid.).

Os anfíbios atraem a atenção dos responsáveis por laboratórios farmacêuticos devido à existência de diversos compostos químicos em suas peles, como é o caso de diversas espécies pertencentes aos gêneros *Brachycephalus*, *Dendrobates*, *Epipedobates*, *Phyllomedusa* e *Lithobates*. Pesquisadores têm descoberto substâncias que podem atuar no tratamento de doenças, porém as possibilidades de novas descobertas de princípios ativos são infinitas (ibid.).

A rã-touro é considerada uma das espécies invasoras mais prejudiciais à natureza. Esta espécie é nativa dos Estados Unidos da América (EUA) até o sul do Canadá e foi introduzida acidentalmente ou intencionalmente, no sul da Europa, Ásia e América do Sul. No Brasil, exemplares de rã-touro foram trazidos em 1935 para iniciar a ranicultura (BRUENING, 2002; GIOVANELLI et al., 2007; IFSC, 2007).

A ocorrência de rã-touro especialmente em áreas da Mata Atlântica (Brasil) tem causado constante preocupação, pois acarreta efeitos deletérios graves nas populações nativas de anfíbios e outros organismos através da competição por alimentos e por serem predadores. Dificilmente esta população invasora será erradicada, mas deve haver o monitoramento pelo governo brasileiro para evitar a introdução de novos exemplares de rã-touro, especialmente em áreas mais adequadas à adaptação da espécie (ibid.).

De acordo com o grupo de especialistas em espécies invasoras da “International Union for Conservation of Nature” (IUCN), a rã-touro é considerada uma das espécies com maior potencial de invasão do planeta. A dieta muito ampla em todos estágios de desenvolvimento facilita sua adaptação tornando-a forte predadora e competidora em comunidades biológicas. Essas características aliadas ao grande porte da rã-touro despertou o interesse com fins comerciais (GUIONE et al., 2008).

Como a maioria dos anfíbios, a rã-touro acasala-se na água, onde seus ovos são depositados e as larvas (denominadas girinos) vivem e crescem até se

metamorfosearem (FERREIRA et al., 2002; LIMA et al., 2000). As rãs recém metamorfosadas recebem o nome de imagos. Na natureza as rãs-touro são predadoras e se alimentam de cobras, insetos, minhocas, crustáceos, girinos, ovos de peixes, salamandras, sapos e rãs (são canibais) (BRUENING, 2002; ROY, 2000).

A principal característica da rã-touro é a presença de membranas interdigitais nos membros posteriores, mas ao contrário de outros anuros é especialmente dependente da água, quer seja para reprodução, equilíbrio hídrico, defesa ou eliminação das excretas (FERREIRA et al., 2002; LIMA et al., 2000). Na rã-touro existe o dimorfismo sexual (Quadro 1).

Quadro 1. Principais diferenças morfológicas entre macho e fêmea de rã-touro

MACHO	FÊMEA
Região gular amarelada	Região gular esbranquiçada
Pavilhão auditivo tem o dobro do tamanho do globo ocular	Pavilhão auditivo tem o mesmo tamanho do globo ocular
Coaxam na época da reprodução	Não coaxam
Membros anteriores mais fortes	Membros anteriores mais frágeis
Apresentam calos sexuais	Não apresentam calos sexuais

Fonte: Ferreira et al. (2002).

Em rãs adultas o esqueleto é ossificado, as extremidades de alguns ossos mantêm a cartilagem da fase larval. A estrutura óssea contribui com 6,5% do peso vivo do animal (LIMA et al., 2000). O ciclo de vida das rãs está representado na figura 1.

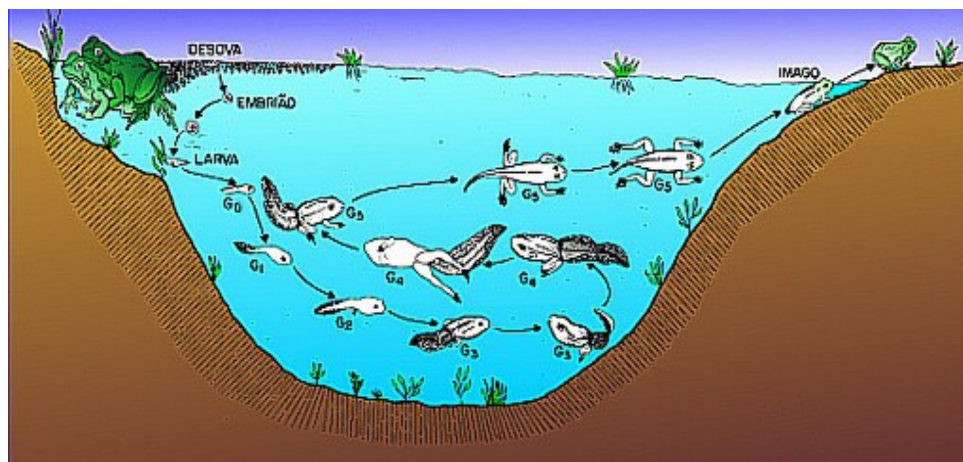


Figura 1. Representação do ciclo de vida das rãs.
Fonte: Lima; Agostinho (1992).

2.1.3 Ranicultura

2.1.3.1 Aspectos gerais

A ranicultura é a criação comercial de rãs em cativeiro, técnica que vem se aprimorando no Brasil desde a introdução de exemplares de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em 1935. Entretanto, os primeiros ranários comerciais só vieram a surgir a partir da década de 70 com o desenvolvimento da tecnologia e a fundação de associações de produtores (FERREIRA et al., 2002; VIZOTTO, 1984).

Na década de 80 a produção de rã-touro deu um grande salto com a introdução da ração nos ranários possibilitando a profissionalização desta atividade. Nesse mesmo período os primeiros abatedouros-frigoríficos foram implantados no Brasil (MARANHÃO, 2006).

Na ranicultura, a preferência por uma única espécie é explicada pelas características zootécnicas: precocidade e prolificidade, uma vez que o animal atinge o peso de abate em seis meses de cultivo e o casal pode originar mais de 20.000 novos indivíduos por acasalamento, que no estado do RJ ocorre duas vezes ao ano (AFONSO, 2008).

O desenvolvimento da rã-touro no Brasil é superior às suas regiões de origem, principalmente pela rusticidade observada no baixo índice de mortalidade [sic], na capacidade de se adaptar aos regimes climáticos brasileiros e aos diferentes manejos adotados (FONTANELLO; FERREIRA, 2006).

Não há estatística consistente sobre a produção, exportação e, ou, importação de rãs (incluindo animais vivos, carne de rã e outros produtos derivados), entretanto a mais confiável é da “Food and Agriculture Organization” (FAO) (TEIXEIRA et al., 2001), que calculou a produção de rãs em toneladas (t) entre 1989 e 2001, observando a média de 5.500 t por ano (Quadro 2) (FEIX et al., 2006).

Em 2001 a produção mundial de carne de rã foi de 6.515 toneladas, provenientes em sua maioria do continente asiático (73%). A produção dessa região caracteriza-se pela captura dos animais em seu ambiente natural, podendo acarretar a insustentabilidade do estoque natural da espécie e induzir a adoção de regulamentações ambientais mais rigorosas (ibid.).

As populações naturais de rãs na Ásia estão diminuindo devido à contaminação ambiental e à captura descontrolada. Em contraste com essa situação, os impactos ambientais da ranicultura no Brasil são tidos como insignificantes. Tanto a área média necessária para a instalação do ranário, quanto os riscos de contaminação das águas ou geração de desequilíbrios para a biodiversidade são reduzidos em relação às demais atividades da aquicultura, tornando a atividade menos vulnerável a pressões ecoprotecionistas (TEIXEIRA, 2002).

Quadro 2. Produção brasileira e mundial de carne de rã (t) no período de 1989 a 2001

País	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Argentina	0	0	0	0	50	50	50	40	30	20	12	60	30
Brasil	40	60	90	120	140	165	304	415	522	580	593	670	790
Cuba	203	137	96	73	52	52	62	69	46	28	26	30	30
Indonésia	1.342	1.590	1.957	2.666	2.411	2.111	2.194	1.795	1.390	1.667	1.317	1.880	1.970
México	461	868	309	350	352	350	547	414	2.063	1.229	382	370	19
Taiwan	327	134	188	784	2.052	1.132	1.378	1.259	730	1.700	1.442	1.666	1.621
Tailândia	6	5	18	131	321	353	137	1.600	1.570	1.600	1.010	1.033	1.163
Mundo	5.060	3.562	4.306	5.563	6.848	5.781	5.556	5.176	5.431	6.506	4.941	5.825	6.515

Fonte: Feix et al. (2006).

Nesse contexto, a posição dominante do Brasil no desenvolvimento de tecnologias voltadas para a criação de rãs em cativeiro pode representar ganhos de competitividade e permitir a entrada do produto nacional em regiões atualmente supridas por produtos oriundos da captura.

O diferencial do Brasil na comercialização da carne de rã-touro foi o desenvolvimento de técnicas de criação, viabilizando-a sem a preocupação da extinção da espécie, problema enfrentado pelos países que comercializam a carne de rã proveniente da caça (LIMA et al., 1999).

Segundo Afonso (2003; 2008) estima-se que exista de 50 a 60 ranários em funcionamento no estado do RJ, entretanto, sabe-se que a maioria possui baixo índice de produtividade, principalmente pela ausência de imagos ao longo do ano.

Além da baixa qualificação técnica aliada à sazonalidade que determina a falta de planejamento na produção, resultando em alta produtividade nos meses de primavera e verão e escassez nos meses de outono e inverno. Enquanto em outras regiões brasileiras com temperaturas mais constantes como: parte do Centro-Oeste, Nordeste e Norte, há produção anual contínua.

A valorização da carne de rã no mercado nacional, a perspectiva de comercializar externamente e a proliferação de informações fantasiosas acerca da rentabilidade da ranicultura atraíram a atenção de investidores rurais, elevando o número de ranários no país. Porém, devido à inadequação das instalações e técnicas de manejo, muitos desses novos produtores foram obrigados a abandonar a atividade (LIMA; AGOSTINHO, 1992).

Mudanças econômicas na década de 90 criaram alterações no cenário da ranicultura, tais como: o preço final de venda da carne de rã limitou o seu consumo; os grandes mercados passaram a exigir o produto legalizado; o início da febre de consanguinidade nos ranários e o aumento do número de doenças. Esses problemas enfrentados pela ranicultura ainda existem, mas são contornáveis, pois tecnicamente há a possibilidade de ajustar a atividade e torná-la economicamente viável. Esta afirmação é fundamentada nos benefícios da carne de rã, pois é um produto nobre capaz de agregar qualidade de vida aos consumidores, devido as características nutricionais: baixo índice de gorduras, hipoalergenicidade, proteína de alto valor biológico e alta digestibilidade (AFONSO, 2008).

Para o êxito da exploração da ranicultura é fundamental a atenção com: manejo; condições de higiene dos criatórios; local e métodos de abate e processamento. A obtenção da matéria-prima dentro dos padrões higiênico-sanitários é muito importante para a qualidade do produto final (LIMA et al., 2000; SANT'ANA, 1997).

2.1.3.2 A produção

A aquicultura (criação de organismos aquáticos para fins comerciais) é uma das atividades consideradas mais promissoras para as próximas décadas. Essa tendência existe devido à exaustão dos recursos pesqueiros naturais e a crescente demanda por alimentos alternativos (LIMA et al., 1999).

A evolução da ciência tem possibilitado o desenvolvimento tecnológico em diversos segmentos produtivos (ibid.).

E o grande volume das pesquisas desenvolvidas por instituições brasileiras sobre ranicultura tem sido direcionado para os sistemas de reprodução e recria, sendo farta a bibliografia nessa área (LIMA et al., 2000; MOURA, 2000).

Entre as demais áreas de produção animal a ranicultura é considerada relativamente nova. A cadeia produtiva compreende: a criação de rãs (ranários), a indústria de abate e processamento e a comercialização dos produtos (LIMA et al., 2000).

A rã-touro tem se destacado no contexto do desenvolvimento da aquicultura brasileira. A carne de rã proveniente de cativeiro é um produto com mercado potencial tanto no Brasil quanto no exterior. Além disso a ranicultura é capaz de suprir a demanda dos produtores rurais que desejam entrar em uma atividade rentável e que não exige elevado investimento financeiro (CRUZ, 1992).

Os modelos das instalações dos ranários em relação às baias de recria, podem ser divididos em seis padrões: Confinamento, Similar ao Confinamento, Anfigranja, Similar a Anfigranja, Baía Inundada e Ranabox (ibid.).

O sistema Anfigranja é a criação intensiva de rãs desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (MG), que possibilitou o aumento de produtividade para a ranicultura. Neste sistema as instalações do setor de engorda são galpões construídos em alvenaria, com piso de concreto e distribuição linear de cochos, abrigos e piscinas (MELLO, 2005).

O sistema Inundado de criações de rãs, utilizado na maioria dos países asiáticos, vem sendo estudado no Brasil e acredita-se que após sofrer pequenas adaptações, este sistema também será utilizado por criadores brasileiros (ibid.).

Na figura 2 consta as etapas da cadeia produtiva no ranário: a desova, a fase de desenvolvimento do girino até a metamorfose e a recria. Concluída esta última fase, as rãs são transportadas para o abatedouro. Depois de processada e embalada a carne é enviada para o mercado consumidor (CRUZ, 1992).

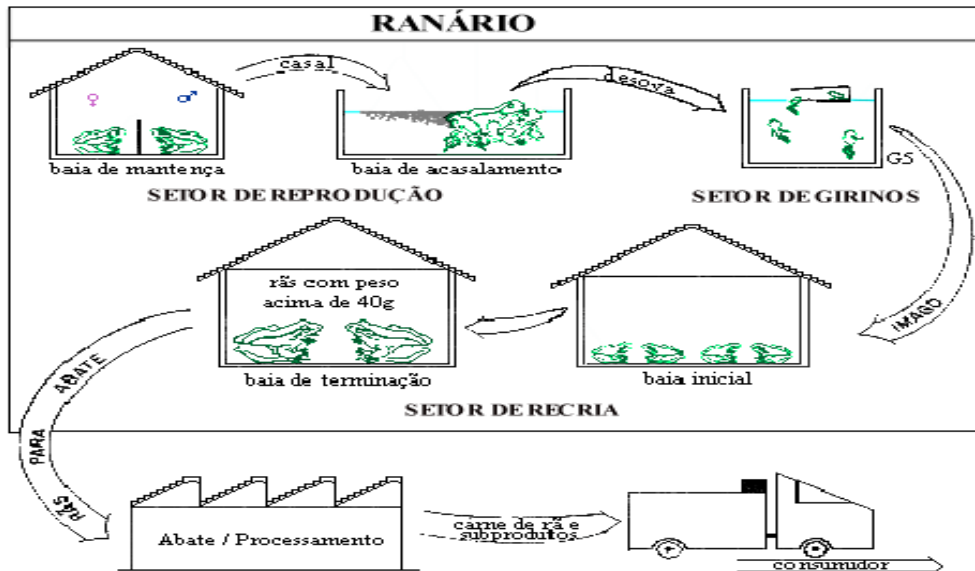


Figura 2. Ilustração da cadeia produtiva da ranicultura.

Fonte: Lima et al. (2000).

Segundo Lima et al. (1999), o ranário com Sistema Anfigranja contém os setores de reprodução, de girinos e de recria.

O setor de reprodução é constituído de duas áreas distintas, as baias de manutenção e as de acasalamento. Na primeira, as rãs reprodutoras são mantidas confortavelmente durante todo o ano, sendo transferidas para as baias de acasalamento quando o ranicultor necessita de desovas. Essas baias de acasalamento podem ser individuais (um casal por vez) ou coletivas (vários casais por vez). Após a reprodução a desova é transferida para o setor de girinos e o casal retorna para a baia de manutenção. Apesar da baia de reprodução ser semelhante às do setor de recria, seus elementos básicos estão em número e dimensões proporcionais ao porte dos reprodutores, que são alojados em uma densidade bem inferior.

O setor de girinos é formado pelo conjunto de tanques construídos em tamanho e número proporcional ao porte do empreendimento. A desova é depositada em incubadeira onde ocorrerá o desenvolvimento embrionário até a saída das larvas, as quais, decorridos alguns dias, darão origem aos girinos propriamente ditos. Nos tanques os animais vão se desenvolver até a metamorfose.

O setor de recria é constituído de baias de recria inicial e baias de terminação. Essas baias consistem de abrigos, cochos e piscinas dispostos linearmente e adequados ao tamanho dos animais. As baias de recria inicial, recebem os imagos após a metamorfose, oriundos ou não da mesma desova. Quando as rãs alojadas nessas baias alcançam de 30 a 40 g são transferidas para as baias de crescimento e

terminação. Estas são destinadas a receberem lotes uniformes de rãs oriundas das baias de recria inicial, onde permanecem até atingirem o peso de abate (200 g). E por último, são enviadas para a indústria de abate e processamento.

2.1.3.3 Abate e processamento

O artigo 438 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) define com a denominação genérica "pescado", os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelôneos e mamíferos de água doce ou salgada usados na alimentação humana; incluindo as rãs dentro desta definição (BRASIL, 1997).

Segundo Loaiza (1996) o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece algumas normas e diretrizes para o abate de rãs, para se obter um melhor aproveitamento higiênico-sanitário dos produtos.

No entanto não existem, sequer para a obtenção do registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF), diretrizes para certificação da unidade de abate de rãs, sendo utilizados para este fim parâmetros comparativos com a unidade de abate de animais de pequeno porte.

Existem em diversos estados brasileiros estabelecimentos de abate de rãs fiscalizados pelo Serviço de Inspeção: Federal (SIF) e Estadual (SIE). E para agregar valor e reduzir custo de abate têm sido realizados estudos que possibilitem o desenvolvimento de novos produtos, usando principalmente os subprodutos do abate (MELLO et al., 2006).

Os abatedouros, de modo geral, operam com baixo nível de profissionalismo e sem padrão de qualidade. A utilização de equipamentos inadequados e improvisados é frequente, provavelmente pela dificuldade de obter outros de qualidade superior. E com isso a qualidade da carne de rã fica comprometida, pois existem deficiências a serem resolvidas (LIMA et al., 1999).

Pela legislação brasileira o abatedouro de rãs é considerado um entreposto de pescado e composto basicamente pelas áreas de: recepção (área suja); evisceração (área limpa); embalagem; congelamento, estocagem e expedição. O estabelecimento que elabora outros produtos além da carne de rã *in natura*, deve possuir também a sala de processamento (LIMA et al., 2000).

Após o recebimento e pré-seleção dos animais há um período de no mínimo 24 horas de jejum e dieta hídrica (para o esvaziamento intestinal e recuperação do estresse de transporte) e posteriormente o animal segue para a linha de abate (ibid.).

A figura 3 ilustra a sequência básica das operações de abate, porém alguns detalhes podem variar entre os estabelecimentos.

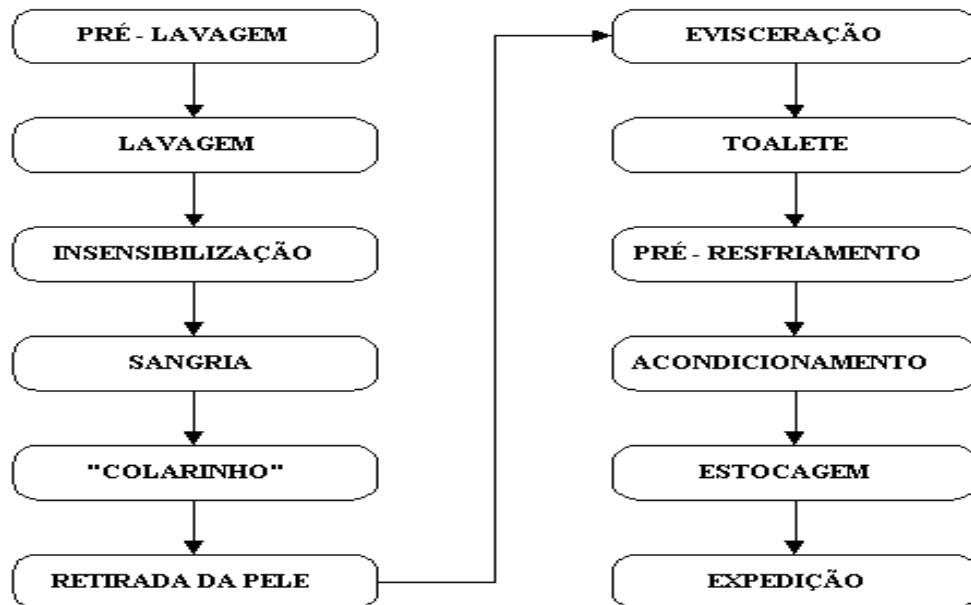


Figura 3. Fluxograma tradicional do abate de rãs.

Fonte: Lima et al. (2000).

Na área suja após a insensibilização da rã ocorre a sangria. Na área limpa se procede a retirada da pele, a evisceração e limpeza final da carcaça. Em seguida, se for o caso, se faz os cortes e o processamento. Depois os produtos são acondicionados em embalagens próprias, rapidamente congelados e armazenados nas câmaras frigoríficas (-20°C) onde permanecem até a expedição (LIMA et al., 2000).

2.1.3.4 Comercialização

As principais formas de comercialização são: a rã inteira, resfriada ou congelada e as coxas congeladas. No Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal Embalado do MAPA a rotulagem de alimentos embalados deve apresentar obrigatoriamente: denominação de venda do alimento; lista de ingredientes; conteúdos líquidos; identificação da origem; nome ou razão

social e endereço do importador (se for o caso); carimbo oficial da Inspeção; categoria do estabelecimento; CNPJ; conservação do produto; marca comercial do produto; identificação do lote; data de fabricação; prazo de validade e instruções sobre o preparo e uso do alimento (BRASIL, 2005).

No Brasil, desde 2003, a rotulagem nutricional é obrigatória nos rótulos dos alimentos e bebidas. Deste modo, o consumidor é capaz de selecionar alimentos saudáveis e evitar o risco de doenças crônicas e alergias (BRASIL, 2003b).

O consumo da carne de rã-touro no Brasil não chega a 300 toneladas ao ano, uma quantidade pequena, pois é uma carne com muitas qualidades, indicada inclusive, para dietas específicas por médicos e nutricionistas. Porém existem fatores limitantes da comercialização: o valor da carne, a falta de hábito, a dificuldade para encontrar o produto e a aparência insatisfatória (BEZERRA, 2006).

Existem vários produtos e subprodutos da ranicultura com potencial econômico, envolvendo animais vivos ou abatidos. A rã viva geralmente é exportada para os EUA, onde os restaurantes especializados na cozinha oriental absorvem grande quantidade do produto. Também existe demanda de rãs vivas para estudos, experiências laboratoriais e para compor o plantel de reprodutores de novos criatórios (LIMA et al., 2000; MELLO, 1997).

Em 1995, aproximadamente nove países importadores de carne de rã adquiriram nove mil toneladas de coxas de rã. Enquanto informações obtidas pela extinta Cooperativa Agropecuária dos Ranicultores do Estado do Rio de Janeiro afirmaram que o rendimento das coxas em relação à carcaça inteira é de 55,5%, portanto, perde-se em média 44,5% da carcaça, aproximadamente quatro mil toneladas anuais (MELLO, 2006).

A carne de rã é comercializada fresca, congelada ou processada. A coxa é a parte de maior aceitação, embora no Brasil esta preferência não seja tão acentuada como no mercado internacional, onde praticamente não se consome o restante da carcaça (LIMA et al., 2000).

A pele e outros resíduos com valor econômico no mercado mundial são descartados pela maioria dos ranicultores nacionais. Enquanto que a concentração do abate em instalações específicas viabiliza economicamente o aproveitamento de todo o animal. O mercado absorve apenas 3% da produção de pele. Os cortes

menos valorizados podem ser processados para fazer “nuggets”, patês, embutidos e conservas (BEZERRA, 2006; LIMA et al., 2000; MELLO, 1997; MOURA, 2003a, b).

A pele representa cerca de 11% do peso vivo do animal, quando curtida pode ser usada na produção de diversos objetos, como por exemplo: casacos, sapatos, bolsas, cintos, carteiras e luvas. Além disso a pele da rã é fonte de colágeno, um tipo de tecido conjuntivo largamente empregado no setor de cosméticos. Este tecido é regenerativo e de grande utilidade no tratamento de queimados, sua translucidez permite a passagem da luz que é fundamental para a cicatrização das lesões. O óleo extraído da reserva de gordura da rã pode ser utilizada na produção de cosméticos. O fígado representa cerca de 5% do peso vivo do animal e pode ser usado na fabricação de patês. Agregar valor ao produto reduz os custos de produção e conseqüente redução dos preços do produto principal (ibid.).

Segundo Mathias (2004) a procura pela carne de rã ainda é pequena, aparentemente a resistência do consumidor ocorre por razões estéticas, de desinformação e preço elevado. Pesquisas de mercado demonstram que os produtores procuram diretamente os supermercados para a venda da carne de rã, estreitando o caminho entre comercialização e o mercado consumidor, sem passar pelos mercados atacadistas e principais varejistas. Em estudo realizado entre 2001 e 2003, pode ser observado que os preços praticados pelos comerciantes para carne de rã inteira e congelada oscilavam entre R\$ 18,00 e R\$ 29,00 por quilo.

Na pesquisa de mercado elaborada pelo Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE/RJ), foi constatado que o comércio da carne de rã no estado do RJ é realizado: 60% por produtores, 20% por cooperativas e 20% por distribuidores. O nível de aceitação da rã inteira eviscerada congelada é maior, seguida da rã inteira eviscerada fresca e, por último, a coxa de rã congelada (WEICHERT, 2007).

2.1.4 Características da carne de rã

Os trabalhos científicos que consideram a rã como alimento humano estão no início, muitos estudos serão necessários para os mais adequados aproveitamentos desta matéria-prima, afluindo todo o seu potencial, pois na rã, teoricamente, tudo pode ser aproveitado (MOURA, 2003a, b).

O estudo do valor nutritivo da carne de rã para o consumo humano e consequente divulgação dos resultados de pesquisas irá despertar o mercado consumidor brasileiro para esta fonte alternativa de proteína de boa qualidade (ibid.).

A carne de rã possui características que a diferenciam da carne de animais de sangue quente. A rã não deposita gordura intracelular, sendo a carne de difícil pigmentação por falta de sítios para a ligação do pigmento (que são normalmente de cadeias longas, apolares e se ligam preferentemente à gordura). O sabor da carne é suave em consequência da ausência de gordura intracelular e a coloração normal é branco-cremosa, portanto definida como carne branca (ibid).

A capacidade emulsificante da carne de rã quando comparada com outras não difere muito em números absolutos (em média 111,13 mL de óleo/g da amostra), sendo similar a carne de bovina magra reportada na literatura (115, 6 mL de óleo/g da amostra) (MOURA, 2003a).

Noll e Lindau (1987) ao analisarem a porção comestível da rã-touro concluíram que esta possui elevado teor protéico; bom índice de digestibilidade; todos os aminoácidos e ácidos graxos essenciais; baixo teor em lipídios; alta porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados e baixo teor de sódio e de calorías.

No quadro 3 observa-se a composição química de diferentes tipos de carne, enquanto no quadro 4 consta a composição centesimal da carne de rã-touro.

Quadro 3. Composição química de diferentes tipos de carne (amostra de 100 g)

Valor Nutricional	Calorias (kcal)	Proteínas (g)	Lipídios (g)	Cálcio (mg)	Fósforo (mg)	Ferro (mg)	Sódio (mg)	Potássio (mg)
Rã-touro	69	16,6	0,3	49,19	203	0,61	80,07	252,34
Peixes de água doce	75	16,6	0,5	20	100	7,0	--	--
Carne bovina	111	28,0	3,0	12	224	3,2	132,3	122,5
Frango	149	21,3	7,1	16	218	1,9	131,0	230,8
Carne suína	181	18,5	11,9	6	220	2,0	101,2	278,8

Fonte: Noll; Lindau (1987).

Quadro 4. Composição centesimal da carne de rã-touro

Composição da carne de rã	Cada 100 gramas
Proteína	17,7 g
Gordura	0,27 g
Açúcares totais	0,0 g
Valor Calórico	73,23 kcal
Colesterol	0,034 g
Gordura saturada	0,1 g
Fibra total	0,0 g
Sódio	0,063 g
Ferro	0,0 g
Cálcio	0,01 g

Fonte: Feix et al. (2006).

Os índices de pH da musculatura de coxas de rãs após o abate com insensibilização em água gelada e sacrifício por concussão cerebral, imediatamente após o sacrifício dos animais é de aproximadamente 6,8 (6,6 a 7,3). Após doze horas o pH médio é de 6,4 (máximo de 6,7). Com 24 horas após o abate, o pH médio é de 5,8 (5,2 a 6,1) (GARCIA et al., 1999; RAMOS, 2004; RAMOS et al., 2005).

Corrêa (1988) não detectou nenhuma alteração significativa de pH na carne de rã congelada, ao longo de 182 dias de armazenamento (-18°C), com valores variando entre 6,28 e 6,51.

A musculatura das rãs possui predominantemente fibras brancas e tem suas reservas energéticas rapidamente esgotadas. Entretanto a queda do pH muscular não é em função apenas da quantidade de ácido láctico produzido com a decomposição do glicogênio muscular, mas também pela baixa capacidade tamponante do músculo da rã-touro (MOURA, 2003a; RAMOS, 2004).

2.2 FATORES RELACIONADOS AOS ALIMENTOS SEGUROS

Os alimentos seguros são aqueles com risco aceitável, uma vez que o risco igual a zero é impraticável devido à quantidade de produtos alimentícios disponíveis,

a complexidade da cadeia de distribuição e a natureza humana. Entretanto, os riscos de ocorrência de doenças de origem alimentar devem ser reduzidos ao máximo durante a sua produção para se obter o risco aceitável (FORSYTHE, 2002).

A dificuldade em produzir alimento seguro baseia-se no fato de que a população de consumidores é bastante diversificada, com vários graus de sensibilidade e estilos de vida (ibid.).

Os alimentos são elementos promotores de saúde, entretanto se produzidos, manipulados ou servidos inadequadamente podem produzir doenças. A obtenção do alimento seguro implica na adoção de cuidados higiênico-sanitários em todas as etapas da cadeia alimentar, desde a produção primária até o consumo. Portanto, cabe aos estabelecimentos alimentícios adotar programas de qualidade com o objetivo de produzir, comercializar e servir alimentos seguros (SOUZA, 2004).

O alimento está contaminado quando contém elementos estranhos à sua natureza e composição, representando perigo para o seu ingestor. A contaminação pode ser física (por exemplo: fios de cabelo), química (por exemplo: resíduos de produtos de limpeza) ou biológica (por exemplo: micro-organismos) (ibid.).

A produção de alimentos seguros é de responsabilidade de todos da cadeia alimentar. E nesse contexto, os aspectos microbiológicos envolvidos, direta ou indiretamente, com o alimento a ser processado são de fundamental importância (FORSYTHE, 2002).

As tecnologias mais eficientes para controlar a deterioração microbiana e garantir a segurança dos alimentos são: o resfriamento; o congelamento; a pasteurização; a esterilização; o enlatamento; a cura; o aumento da concentração e a aplicação de conservantes (ibid.).

Os micro-organismos possuem muitas particularidades na forma de agir sobre os alimentos devido aos fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam o crescimento microbiano. Os principais fatores intrínsecos são: água de atividade; potencial hidrogeniônico (pH); disponibilidade de oxigênio; nutrientes disponíveis; substâncias naturalmente antimicrobianas; a composição química e interações entre micro-organismos. Os principais fatores extrínsecos são: temperatura de conservação; umidade relativa do ambiente; composição atmosférica e a embalagem (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003; JAY, 2005).

2.2.1 Carne de rã *versus* alimentos seguros

A palavra carne pode ser definida como todos os tecidos animais que são convenientes para o uso como alimentos, obtidos de animais saudáveis, respeitando técnicas higiênicas-sanitárias durante o abate e o posterior manuseio. Nessa definição estão incluídos todos os produtos processados ou manufaturados que podem ser preparados de tecidos animais (MOURA, 2003a).

A carne de rã está sujeita a várias fontes de contaminação ao longo da cadeia de produção. As baias devem ser de fácil higienização, tamanho ajustado para o número de animais, controle efetivo de pragas e animais predadores, deve-se evitar a proximidade de fontes poluentes, possuir água em boa quantidade e qualidade e o alimento fornecido às rãs deve ser isento de contaminação. Portanto, com cuidados simples na produção pode-se obter matéria-prima de boa qualidade, o que é fundamental para garantir a segurança do produto final (RODRIGUES et al., 1994).

A contaminação pode ocorrer em todas as operações de abate, armazenamento e distribuição e sua intensidade depende da eficiência das medidas preventivas adotadas. No processamento industrial existem vários pontos a considerar: ao selecionar os animais na chegada deve-se descartar os doentes ou mortos; fazer jejum hídrico 24 horas antes do abate; evitar a perfuração das vísceras; evitar o contato da pele do animal na carcaça e lesões; usar água corrente e clorada; as instalações, os equipamentos e os manipuladores devem atender às exigências higiênicas-sanitárias necessárias à manutenção de uma carga microbiana compatível com características que não tragam risco à saúde do consumidor (ROÇA, 2000; RODRIGUES et al., 1994).

O aprimoramento de técnicas na ranicultura permitiu o aumento da produtividade, em contrapartida há carência de trabalhos científicos que abordem a carne de rã como matéria-prima para a indústria alimentícia (LIMA et al., 2000; MOURA, 2000).

As rãs são reservatórios da *Salmonella* spp. e, portanto, desempenham importante papel na epidemiologia da salmonelose (SILVA; OLIVEIRA, 1994). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a salmonelose é uma das mais importantes doenças de origem alimentar, devido ao número de pessoas afetadas, complicações e sequelas da doença, quantidade de produtos alimentícios

contaminados e perdas econômicas com tratamento médico-hospitalar e/ou desperdício de alimentos (KAKU et al., 1995).

As coxas de rãs congeladas contaminadas por salmonelas, se forem bem cozinhas antes do consumo não oferecem perigo ao ingestor, porém se mal-cozidas ou re-contaminadas após o cozimento podem causar agravos (ANDREWS et al., 1977).

A contaminação da carne de rã pela *Salmonella* spp. tem sido um dos grandes desafios da indústria há anos. As exportadoras da carne de rã investem milhões anuais para vender um produto de qualidade e, principalmente, sem salmonela (CHRISTIAN, 1981; ROY, 2000; TAMBUNAN; HERUWATI, 1978).

Gray et al. (2007) concluíram que a rã-touro pode ser reservatório da *Escherichia coli* O157:H7, principalmente quando a água utilizada no manejo da rãicultura é proveniente de local que possua rebanhos leiteiros nas proximidades, sendo a água um importante veículo de transmissão da *E. coli* O157:H7 para as rãs, e estas por sua vez, disseminadoras da bactéria no ambiente.

O controle microbiológico da exportação da carne de rã é estabelecido pelo *Codex Alimentarius* em um código de práticas para as coxas de rã. Este código determina requisitos mínimos de higiene que devem ser observados na produção, elaboração, manipulação, embalagem, armazenamento, transporte e distribuição, para assegurar a qualidade e inocuidade do produto. E o produto final deve passar por métodos apropriados por amostragem e avaliações, que determinam o uso das BPF; as rãs devem estar isentas de parasitos, contaminantes químicos, resíduos de praguicidas e, ou, aditivos alimentares, micro-organismos e substâncias procedentes dos micro-organismos em quantidades que representem risco para a saúde do consumidor (CODEX, 1983; TEIXEIRA, 2001).

Alguns pesquisadores, como: Corrêa (1988), Loaiza (1996), Rodrigues et al. (1994), Shrivastava (1978), Silva e Oliveira (1994; 1997) e Yde et al. (1985), encontraram micro-organismos em carne de rã, ressaltando-se a importância de maior fiscalização da cadeia e mais pesquisas na área.

2.2.2 Congelamento da carne

O congelamento é a etapa em que os alimentos passam da temperatura original para faixas de temperaturas abaixo de 0°C em seis horas ou menos e assim

inibe o crescimento microbiano e/ou retarda o processo metabólico (MADEIRA; FERRÃO, 2002).

Segundo o RIISPOA, produtos congelados são aqueles devidamente acondicionados, submetidos a processos adequados de congelamento em equipamento que permita a ultrapassagem da zona crítica, compreendida de $-0,5^{\circ}$ a -5°C em tempo não superior a duas horas. O produto somente pode ser retirado do equipamento congelador após a temperatura de seu centro térmico alcançar -18°C . E as câmaras de estocagem do estabelecimento produtor devem possuir condições de armazenar o produto a temperaturas não superiores a -18°C (BRASIL, 1997).

Os alimentos congelados quando são processados, manipulados e armazenados de forma adequada apresentam características sensoriais e nutritivas muito similares às que possuíam antes de seu congelamento, pois é quase impossível evitar certas mudanças na qualidade dos alimentos durante sua aplicação (ORDÓNEZ et al., 2005a).

O desenvolvimento de micro-organismos, de reações químicas ou de mudanças físicas na carne congelada está muito relacionado com o conteúdo em água da carne e com a água disponível durante o decurso das reações. Por exemplo: a carne magra contém aproximadamente 75% de água, logo começa a congelar em temperaturas abaixo de $-1,5^{\circ}\text{C}$, mas não de forma completa, pois sempre haverá uma fração líquida maior ou menor, dependendo da temperatura (ORDÓNEZ et al., 2005b). Nesse produto a -5°C aproximadamente 75% da água transforma-se em gelo e a -20°C aproximadamente 85%, o restante da água encontra-se tão fortemente ligada à proteína que não é possível congelá-la nem mesmo com temperaturas mais baixas (BOURGEOIS et al., 1994; ORDÓNEZ et al., 2005b).

O tipo de cristal de gelo formado no congelamento e sua distribuição nos espaços intra e extracelulares são de grande interesse para a qualidade da carne congelada (ORDÓNEZ et al., 2005b). O ideal é o congelamento rápido para manter a qualidade do pescado com menor formação de exsudados, pois forma-se grande número de pequenos cristais, tanto dentro como fora da fibra muscular e permite a passagem da zona crítica de congelamento em menos de duas horas (BOURGEOIS et al., 1994; JAY, 2005; ORDÓNEZ et al., 2005b).

O congelamento afeta de várias maneiras os micro-organismos, pois além da queda da temperatura reduzir a velocidade de multiplicação da microbiota, a transformação da água em gelo diminui a quantidade de água livre disponível para os micro-organismos presentes no alimento, além de alterar a estrutura e o metabolismo deles, inclusive desencadeando a morte de alguns indivíduos. Entretanto, o congelamento não produz efeito bactericida, ainda que reduza de maneira discreta a população microbiana inicial. Para as bactérias Gram-negativas, que são micro-organismos mais sensíveis, a redução da população inicial após o congelamento é maior do que as Gram-positivas. Contudo, se a microbiota inicial for grande no momento do congelamento, também será depois do armazenamento e descongelamento e os sobreviventes irão se proliferar ativamente (ibid.).

Jay (2005) afirma que as toxinas e os esporos aparentemente não são afetados por temperaturas baixas e as salmonelas, apesar de serem Gram-negativas, podem sobreviver por nove meses à $-25,5^{\circ}\text{C}$. Enfatizando que a técnica de congelar alimentos não deve ser considerada um procedimento para destruir os micro-organismos. Outro fator importante é o descongelamento do alimento, uma vez que o descongelamento lento causa perda de peso por exsudação e alterações físico-químicas que não ocorrem quando o descongelamento é feito rápido em temperatura igual ou inferior a 4°C . Além disso, a exsudação superficial favorece o desenvolvimento de patógenos como as salmonelas.

2.3 MICRO-ORGANISMOS ENVOLVIDOS

2.3.1 *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).

O gênero *Salmonella* 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. Descarboxilam a lisina, a ornitina e a arginina. Produz H_2S , não há hidrólise da uréia e a utilização do malonato é variável.

São catalase positivos, indol e Voges-Proskauer negativos, vermelho de metila e citrato de Simmons positivos. O gênero possui morfologia de bastonete medindo 0,7 a 1,5 x 2 a 5 µm (BOURGEOIS et al., 1994; FORSYTHE, 2002; LE MINOR, 1984; HOLT et al., 1994).

Para os sorovares da subespécie entérica, mais de 99,5% das estirpes isoladas, são dados nomes que não são colocados em itálico e a primeira letra deve ser escrita em maiúscula, como segue o exemplo: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis ou *Salmonella* Enteritidis (LE MINOR, 1984; HOLT et al., 1994).

As salmonelas podem ser divididas em três categorias com base na especificidade do hospede e padrão clínico por eles determinado: salmonelas altamente adaptadas ao homem (incluindo os sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica - febres tifóide e paratifóide); salmonelas altamente adaptada aos animais (representadas por *S. Dublin* nos bovinos, *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* nos suínos, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* nas aves - responsáveis pelo paratifo dos animais) (ibid.).

Em determinadas situações (idade jovem, pacientes com doenças crônicas, idosos, imunocomprometidos) os sorovares *S. Dublin* e *S. Choleraesuis* podem determinar no homem um quadro septicêmico, mais grave que o causado por *S. Typhi*. E a terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem indiferentemente o homem e os animais, são as salmonelas zoonóticas responsáveis por quadros de gastroenterites ou doenças de origem alimentar (ibid.).

Comparando com outros bastonetes Gram-negativos, as salmonelas são relativamente resistentes a vários fatores ambientais. Crescem em faixa de temperatura de 5°C a 45°C, com temperatura ótima de 37°C. Se desenvolvem em pH na faixa de 4,5 a 9,0, valores abaixo do primeiro e acima do segundo são considerados bacteriostáticos para o micro-organismo, sendo considerado pH ótimo para seu crescimento entre 6,5 e 7,5. E crescem em alimentos com até 0,93 de atividade de água (BOURGEOIS et al., 1994; VARNAM; EVANS, 1996), porém se desenvolvem 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 raramente a destruição completa (GLEDEL, 1994; SILVA, 2000).

A salmonela é sensível ao calor, não sobrevivendo à temperatura superior a 70°C (HOLT et al.,1994; JAY, 2005; LE MINOR, 1984). A relativa resistência que estes micro-organismos apresentam à dessecação, congelamento, salmoura e defumação, explica porque sobrevivem em muitas classes de alimentos (JAY, 2005; RODRIGUES, 2005).

O gênero *Salmonella* tem grande importância para a Saúde Coletiva considerando seu caráter zoonótico e sua ampla distribuição na natureza. Entre os 2.500 sorotipos de salmonelas existentes, a maioria tem sido responsável por surtos de doenças de origem alimentar em vários países do mundo, incluindo o Brasil (TAUNAY, 1996).

A capacidade de disseminação no meio ambiente permite que a salmonela seja isolada de locais variados (por exemplo: águas doces superficiais, costa marítima, carnes de animais, pescados, verduras e ovos) e conseqüentemente, de diversas matérias-primas alimentares. Pode ainda ser veiculada pelo próprio homem, neste caso na condição de portador assintomático (JAKABI; BUZZO, 1999). Por ser um micro-organismo entérico, pode estar presente no intestino de animais de sangue quente e de sangue frio (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A salmonelose pode ser definida como a infecção provocada pela ingestão de alimentos contaminados com um número significativo, de qualquer espécie de *Salmonella* spp. A presença constante deste micro-organismo no trato intestinal de animais de açougue determina a incidência em carnes ser relativamente alta, porém a quantidade encontrada varia de acordo com as condições de manejo durante a criação, 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 (SILVA, 2000).

A produção industrial de alimentos de origem animal e o intercâmbio comercial intensivo de animais e produtos derivados destinados ao consumo humano têm favorecido a introdução e disseminação de novos sorotipos de salmonelas na cadeia alimentar. Isto se deve, principalmente, às trocas dos hábitos alimentares, à maneira pela qual os produtos de origem animal são comercializados e às deficiências de produção, estocagem e distribuição desses produtos (CAFFER; EIGUER, 1994).

Segundo Barreto e Vieira (2002) a cada ano surgem aproximadamente 800.000 a 4.000.000 de novos casos de *Salmonella* spp. e resultam em 500 mortes nos EUA, sendo as crianças as que mais frequentemente contraem a bactéria.

A simples presença de salmonela no alimento não é suficiente para causar a doença, sendo importante o número de células presentes e a virulência do sorotipo envolvido. Fatores ligados ao hospedeiro como espécie, raça, idade, condições sanitárias, imunológicas e nutricionais, também influenciam (PINTO, 2000). A dose infectante pode variar em função do sorotipo e da afinidade dos mesmos a determinadas espécies animais (JAY, 2005).

Apesar da *Salmonella* spp. ser um micro-organismo de ampla disseminação e potencialmente capaz de causar infecções alimentares, o mesmo é facilmente destruído quando submetido a temperaturas de 66,6°C por 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; PINTO, 2000).

Geralmente as salmonelas são encontradas em pequenas quantidades nos alimentos, pois não são boas competidoras além de serem fortemente inibidas pela microbiota láctica, bem como pelas demais bactérias deteriorantes e, ou, patogênicas presentes nos alimentos (PINTO, 2000).

Os principais alimentos envolvidos em surtos são aqueles com alto teor de umidade e com alta porcentagem de proteína. Produtos lácteos, à base de ovos (por exemplo: maioneses), carnes (por exemplo: de bovinos, de suínos, de aves, de peixes, de camarões, de pernas de rã), produtos derivados da carne, entre outros (GERMANO; GERMANO, 2003).

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, 2005; SILVA, 2000).

Na infecção alimentar por *Salmonella* spp. a síndrome é causada pela ingestão de alimentos que contenham números significativos de espécies ou sorovares. Os sintomas surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão de alimentos, embora períodos mais curtos e longos já tenham sido relatados. Estes

consistem em: diarreia, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça e calafrios. Também pode ocorrer fraqueza, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo e sonolência (GLEDEL, 1994; JAY, 2005).

O quadro clínico pode persistir por um a dois dias e a recuperação, na maioria dos casos, ocorre após três dias do início da infecção. Estes prazos dependem da dose infectante ingerida, do sorotipo envolvido e das condições do próprio hospedeiro (GERMANO; GERMANO, 2003; GLEDEL, 1994; JAY, 2005).

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 cólon. As salmonelas se multiplicam, aderindo-se às células epiteliais da região ileocecal, penetram nas células da mucosa, injuriando-as e migrando para a lâmina própria (TOLEDO, 1998).

No caso das enterocolites, as salmonelas penetram nas células epiteliais intestinais, se multiplicam e ficam restritas à lâmina própria até serem fagocitadas pelos macrófagos e monócitos, resultando em resposta inflamatória. Nestes casos, raramente se observa septicemia, ficando a infecção restrita à mucosa intestinal (PINTO, 2000).

Nos quadros de febre tifóide e febre entérica a infecção se inicia de maneira semelhante à enterocolite, entretanto nas infecções sistêmicas a bactéria é introduzida na corrente sanguínea por via linfática acarretando em sintomas muito mais graves (TOLEDO, 1998). A febre tifóide pode perdurar por até oito semanas, enquanto a febre entérica dura no máximo três semanas (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Para prevenir a contaminação da carne deve-se atentar para as possibilidades de contaminação do animal e 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. Assim como devem ser aplicadas medidas de higiene nos criatórios e durante o abate, principalmente na etapa de evisceração que é um ponto crítico de controle (BOURGEOIS et al., 1994; PARDI et al., 2001).

Para prevenir a ocorrência da salmonelose deve-se ter medidas de higiene rigorosas no preparo e na manipulação dos alimentos em estabelecimentos

alimentícios, pois esses são os principais locais de surtos devido aos portadores assintomáticos (BOURGEOIS et al., 1994; JAY, 2005).

Os manipuladores de alimentos devem passar por exames periódicos de fezes, aqueles considerados portadores positivos a medida recomendada é o afastamento da função até que o exame de seis coproculturas chegue a resultados negativos (PARDI et al., 2001).

Para evitar a contaminação cruzada, especialmente dos alimentos cozidos pelos crus, devem ser adotadas as seguintes medidas: higienização das mãos, utensílios e superfícies sempre que entrar em contato com o alimento. Assegurar a cocção suficiente dos alimentos seguido de refrigeração rápida (quando forem armazenados); refrigerar os alimentos quando possível e evitar deixá-los muito tempo a temperatura ambiente; controlar os vetores e pragas através de empresa certificada e aumentar a vigilância e detecção de salmonelas sobre os alimentos cozidos (BOURGEOIS et al., 1994; GLEDEL, 1994).

As ferramentas mais eficientes para se evitar perigos biológicos (como as salmonelas), físicos e químicos nos alimentos provenientes da indústria são: a implantação e manutenção das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do plano de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (FORSYTHE, 2002; GERMANO; GERMANO, 2003).

2.3.2 ***Staphylococcus Coagulase Positiva***

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae*, são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos, imóveis, anaeróbicos facultativos, com maior crescimento sob condições aeróbicas (quando produzem a enzima catalase). Possui de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro e quando vistos ao microscópio aparecem na forma de cachos, pares ou cadeias curtas (BOURGEOIS et al., 1994; FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003; MADIGAN et al., 2004).

Com o avanço da biologia molecular em estudos de análise comparativa de sequências de Ácido Ribonucléico (RNA) ribossomal, foram identificadas três linhagens celulares filogeneticamente distintas e designadas domínios evolutivos, sendo denominados *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*. No domínio *Bacteria* são conhecidos 17 linhagens (filos) principais a partir de estudos de culturas laboratoriais, muitas outras são identificadas pela recuperação e sequenciamento de

genes RNA ribossomal de bactérias coletadas a partir de “habitats” naturais. Os estafilococos possuem baixo conteúdo de guanina-citosina. Há ainda outros gêneros inclusos neste filo, como *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Sendo o gênero *Staphylococcus* diferenciado dos demais por possuir ácido tecóico na parede celular, que consiste em proteínas e polissacarídios (MADIGAN et al., 2004).

Os estafilococos são mesófilos, crescem na faixa de temperatura entre 6°C e 46°C, porém produzem as enterotoxinas na faixa entre 10°C e 46°C, com crescimento ótimo a 37°C. O pH ótimo situa-se próximo da neutralidade, entre 6,0 e 7,0, mas o crescimento poderá ocorrer entre valores de 4,0 e 9,8. Com relação à água de atividade considera-se o crescimento viável entre 0,83 a 0,99. Outra característica importante do gênero é a tolerância a concentrações de 10% a 20% de cloreto de sódio (NaCl). Os estafilococos podem ser divididos em dois grupos de acordo com a produção da enzima coagulase: os que possuem capacidade de coagular ou não o plasma sanguíneo (BOURGEOIS et al., 1994; FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003; JAY, 2005).

A espécie que está associada mais frequentemente às doenças estafilocócicas, quer sejam de origem alimentar ou não é o *Staphylococcus aureus*. Esta espécie de maior interesse em microbiologia de alimentos é coagulase positiva (BOURGEOIS et al., 1994; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O *S. aureus* apresenta distribuição mundial e o reservatório do micro-organismo são os seres humanos. Estima-se que 20% até 60% da população humana possa ser portadora da bactéria, sem apresentar qualquer tipo de doença. Nestas circunstâncias, os portadores humanos, mesmo em condições normais de saúde, sempre representam risco quando lidam com alimentos, pois podem contaminá-los durante as diferentes fases de preparação, através das mãos e das secreções oro-nasais. Os portadores de infecções purulentas, notadamente nas mãos, devem se abster de lidar com quaisquer tipos de alimentos (GERMANO; GERMANO, 2003). Os animais domésticos também são portadores ou apresentam-se contaminados com a bactéria, apesar da disseminação entre as espécies parecer limitada (BOURGEOIS et al., 1994; CVE, 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O crescimento dos estafilococos nos alimentos pode ser reprimido e, ou, retardado devido a competição com outros tipos de bactérias, pois são maus competidores. Por isso, raramente causa doenças alimentares após a ingestão de

produtos crus. Entretanto, nos alimentos tratados pelo calor não se observa a competição, crescendo então sem restrições (FORSYTHE, 2002; PARDI et al., 2001).

S. aureus coagulase positiva podem estar presentes em vários alimentos, como: carnes e produtos cárneos; aves e ovos; saladas com ovos, atum, galinha, batata, macarrão; patês, molhos, tortas de cremes, bombas de chocolate e outros; sanduíches com recheios; produtos lácteos e derivados. São de alto risco os alimentos que requerem considerável manipulação para seu preparo e os que permanecem em temperatura ambiente elevada por muitas horas após o preparo (CVE, 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Desde que o alimento apresente boas condições para o crescimento de *S. aureus*, o mesmo poderá causar intoxicação, portanto, o maior perigo envolvendo esse micro-organismo em alimentos é a pré-formação de toxinas, conhecidas como enterotoxinas (BOURGEOIS et al., 1994; FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003; JAY, 2005). O *S. aureus* produz sete enterotoxinas distintas: A, B, C1, C2, C3, D e E. A enterotoxina "A", um superantígeno, corresponde aquela mais frequentemente associada à intoxicação alimentar estafilocócica (MADIGAN et al., 2004).

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais enterotoxinas. Embora a produção de enterotoxinas esteja geralmente associada a *S. aureus* coagulase e termonuclease positivos, algumas espécies de estafilococos que não produzem nenhuma dessas enzimas também podem produzir enterotoxinas (JAY, 2005).

Os sintomas da gastroenterite estafilocócica são: náuseas, vômitos, diarreias, dor abdominal, dor de cabeça, câimbras abdominais bem dolorosas, sudorese, podendo ocorrer também calafrios, queda da pressão arterial e raramente febre. O início ocorre de 30 minutos a oito horas após a ingestão da enterotoxina. Os sintomas variam pela suscetibilidade do indivíduo à toxina, pela quantidade de toxina no alimento e pela saúde da pessoa. A mortalidade é baixa e geralmente a doença é autolimitante, durando de dois a três dias (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Quando os alimentos são mantidos sob refrigeração após o preparo, geralmente permanecem seguros, uma vez que o crescimento de *S. aureus* é

significativamente reduzido em temperaturas baixas. Se o alimento for contaminado por *S. aureus* proveniente de um manipulador, poderá ocorrer o rápido crescimento bacteriano e a produção de enterotoxinas. Mesmo que alimentos contendo toxinas sejam submetidos ao reaquecimento, as toxinas permanecem ativas, pois são termorresistentes (MADIGAN et al., 2004).

A real frequência da intoxicação estafilocócica é desconhecida, mas em Saúde Coletiva o *S. aureus* é considerado como um dos mais frequentes causadores de surtos de toxinfecção alimentar. Esse dado ocorre devido ao papel desempenhado pelos manipuladores durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos, somado aos riscos de contaminação das matérias-primas desde sua origem e às temperaturas inadequadas de conservação pós-coção (GERMANO; GERMANO, 2003).

Em geral pode-se esperar a presença de estafilococos, mesmo que em pequenas quantidades em quase todos os alimentos de origem animal ou naqueles diretamente manipulados, a não ser que tenham sido aplicados tratamentos térmicos para a destruição desses micro-organismos (JAY, 2005).

Os alimentos susceptíveis com baixas contagens de estafilococos permanecem livres de enterotoxinas e outros riscos de intoxicação se mantidos abaixo de 4,4°C ou acima de 60°C, até serem consumidos. Dentre fatores identificados comumente envolvidos em surtos, destaca-se: refrigeração inadequada, alimentos preparados com muita antecedência, manipuladores infectados com hábitos de higiene pessoal insuficientes, cozimento ou processamento inadequado e alimentos mantidos sob aquecimento em temperaturas que favorecem o crescimento bacteriano (ibid.).

Os estafilococos encontram-se amplamente disseminados na natureza e as medidas de controle e prevenção necessárias para evitar a contaminação do alimento por enterotoxinas estafilocócicas, tais como: armazenar os alimentos em temperaturas adequadas, controle da saúde dos manipuladores de alimentos, capacitação permanente quanto aos hábitos higiênico-sanitários e evitar a contaminação cruzada (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003; JAY, 2005).

2.3.3 Coliformes

O grupo coliforme é constituído por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, são Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, reduzem o nitrato (NO_3) a nitrito (NO_2), são oxidase negativas e fermentam a lactose formando ácido e gás após incubação à 35°C no período de 48 horas (FORSYTHE, 2002; FRANCO; LANDGRAF, 2003; KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Este grupo é composto predominantemente por bactérias dos gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destes, apenas a *Escherichia coli* tem como “habitat” primário o trato intestinal do homem e animais. Os demais, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao de bactérias patogênicas de origem intestinal como *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. Consequentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os coliformes são destruídos com certa facilidade pelo calor, porém são úteis para análise de contaminação pós-processamento. A presença de coliformes pode indicar se um determinado alimento recebeu tratamento térmico inadequado durante o processamento ou se foi mal manuseado e contaminado após o processamento. Portanto, são indicadores da segurança dos alimentos e do processamento industrial (FORSYTHE, 2002; KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Segundo Franco e Landgraf (2003) as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, tanto as fermentadoras de lactose quanto as não-fermentadoras, podem ser enumeradas como indicadores da contaminação fecal, uma vez que: as bactérias do grupo coliforme são mal definidas taxonomicamente; números falsos podem ser obtidos quando se verifica a presença de micro-organismos fermentadores da lactose, mas a população predominante é de não fermentadores da lactose; e cepas de *Salmonella* spp. podem ser mais resistentes do que a *E. coli* e outros coliformes a determinados tratamentos aos quais os alimentos são submetidos.

Os coliformes fecais (ou termotolerantes) são definidos como coliformes capazes de fermentar a lactose em meio de cultura Caldo *Escherichia coli* (EC) com produção de ácido e gás após incubação à 44,5° a 45,5°C no período de 48 horas. Um teste para coliformes fecais significa um teste para *E. coli* típicas, embora

algumas espécies de *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. se adequem a esta definição (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005; KORNACKI; JOHNSON, 2001).

Dentre as bactérias de “habitat” reconhecidamente fecal, a *E. coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos membros não entéricos. Embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais, ainda sim é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento, principalmente, pela sua relação com a presença de outros enteropatógenos, como por exemplo a *Salmonella* spp. (JAY, 2005).

A *E. coli* é um mesófilo típico capaz de se desenvolver entre 7°C e 46°C, sendo 37°C a temperatura ótima, embora existam estirpes que possam se multiplicar a 4°C. É destruído a 60°C em poucos segundos, mas é capaz de resistir por longo tempo em temperaturas de refrigeração. O pH, próximo do neutro, propicia condições ótimas para o desenvolvimento da *E. coli* a multiplicação pode ocorrer abaixo dos 4,4, desde que os demais fatores intrínsecos e extrínsecos sejam ótimos. A água de atividade mínima exigida para desenvolvimento é de 0,95. Todas as estirpes patogênicas de *E. coli* são destruídas pelos desinfetantes clorados e pelas radiações gama (GERMANO; GERMANO, 2003).

Dentre os agentes de doenças de origem alimentar, a *E. coli* passou a merecer especial atenção da indústria de produtos alimentícios, das autoridades de saúde e também da própria sociedade, todos preocupados com suas graves consequências (ibid.). Segundo Franco (2002) a presença de *E. coli* nos alimentos em quantidades elevadas é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e da presença de outros micro-organismos enteropatogênicos.

As linhagens patogênicas de *E. coli* são divididas pelos sintomas clínicos e pelos mecanismos de patogenicidade. São conhecidos seis grupos de *E. coli* virulentos: *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (FORSYTHE, 2002; GERMANO; GERMANO, 2003; JAY, 2005).

Dentre as inúmeras estirpes enterovirulentas do micro-organismo, a que constitui maior apreensão para as autoridades de saúde é a *E. coli* O157:H7 responsável pela forma enterohemorrágica da infecção (ibid.). A dose infecciosa

para a *E. coli* O157:H7 é desconhecida, no entanto, a compilação de dados de surtos indica que pode ser tão baixa quanto 10 células, especialmente em crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas (FORSYTHE, 2002).

A *E. coli* faz parte da microbiota normal do trato intestinal do homem e de diversos animais. A maioria das estirpes patogênicas relacionadas aos distúrbios gastrointestinais, com exceção das estirpes EHEC que estão relacionadas à Colite Hemorrágica e a Síndrome Urêmica Hemorrágica, é de origem humana, contudo algumas estirpes ETEC responsáveis por doenças humanas são carregadas através dos animais (VARNAN; EVANS, 1996).

As diarreias causadas por *E.coli* apresentam distribuição mundial, porém devido à elevada subnotificação de casos, não se sabe qual a real extensão de ocorrência, mesmo em países desenvolvidos (GERMANO; GERMANO, 2003; JAY, 2005).

Em áreas onde a diarreia é endêmica geralmente não é possível relacionar a doença com alimentos específicos. A partir dos relatos de surto têm-se informações que além da água de bebida, outros alimentos já foram identificados como veículo, com destaque para a carne e seus derivados, o leite e seus derivados e os alimentos manipulados (ibid.).

Medidas de controle e prevenção são necessárias para se evitar a contaminação do alimento por coliformes totais e fecais. Sendo fundamentais: a higiene no abate; a conservação das matérias-primas abaixo dos 7°C; a pasteurização dos produtos lácteos e dos sucos de frutas; os cuidados na manipulação de alimentos de origem animal crus e processados; as medidas adotadas para evitar a contaminação cruzada; a higiene das instalações, superfícies e equipamentos nas cozinhas; o tratamento térmico dos alimentos cárneos (temperatura igual ou superior a 60°C); o resfriamento rápido dos alimentos processados e a adoção das BPF e do sistema APPCC nas indústrias (GERMANO; GERMANO, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense – UFF.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Amostras

As amostras de carnes de rã foram adquiridas no comércio varejista do município do Rio de Janeiro, estado do RJ - Brasil. Imediatamente foram submetidas à refrigeração na embalagem original, transportadas em bolsas isotérmicas e posteriormente acondicionadas no freezer ($- 18^{\circ}\text{C}$) do laboratório.

O número representativo das amostras satisfaz as exigências de amostragem para diagnóstico analítico, em conformidade com o método de amostragem previamente descrito (DI GIACOMO; KOEPESELL, 1986; MARTIN et al., 1987).

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Controle de qualidade dos meios de cultura

A eficácia da esterilização em autoclave foi confirmada com o uso de ampolas Sterikon[®] bioindicador (Merck[®] nº 1.10594) que contém caldo nutritivo, indicador de pH e esporos de *Geobacillus stearothermophilus*. As ampolas foram autoclavadas

conjuntamente com o material a ser utilizado no experimento. Após a esterilização, as ampolas foram incubadas a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Em esterilizações eficientes não há alteração do meio, pois os esporos do referido micro-organismo são destruídos; caso contrário, ocorre a germinação dos esporos que é observada a partir da viragem do indicador para amarelo, pela produção de ácido e turbidez em consequência do crescimento da microbiota padrão (MERCK, 2000).

Os meios de cultura foram confeccionados em quantidades suficientes para o uso durante uma semana.

A vidraria utilizada foi previamente esterilizada em forno Pasteur a 170°C por uma hora e as soluções e meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave conforme suas respectivas especificações, tomando-se o cuidado de não operar com autoclave muito cheia, para facilitar a transmissão de calor.

3.3.2 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados utilizou-se a análise estatística descritiva simples que constou de percentuais, gerando tabelas.

3.3.3 Obtenção e preparo das subamostras em laboratório

A realização desta pesquisa iniciou após a compra, no comércio varejista do município do Rio de Janeiro, de 30 amostras de carnes de rã inteiras, em forma de carcaças, evisceradas e limpas, congeladas e contidas em embalagem de polietileno (Figura 4), pesando cada uma delas aproximadamente 500 g.

Para se obter essas 30 amostras de carnes de rã de lotes diferenciados para análise bacteriológica, foram verificados 116 produtos em 94 locais visitados. Em todos estes foram observados: a rotulagem, os preços, a forma de apresentação e o acondicionamento da carne de rã.

Entretanto, devido à dificuldade em achar a carne de rã no comércio, foram obtidas aleatoriamente 11 amostras da marca A, 13 amostras da marca B e 6 amostras da marca C; de lotes e datas de fabricação distintas. Compradas nos meses de outubro e novembro de 2008 e analisadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal da UFF em novembro e dezembro de 2008.

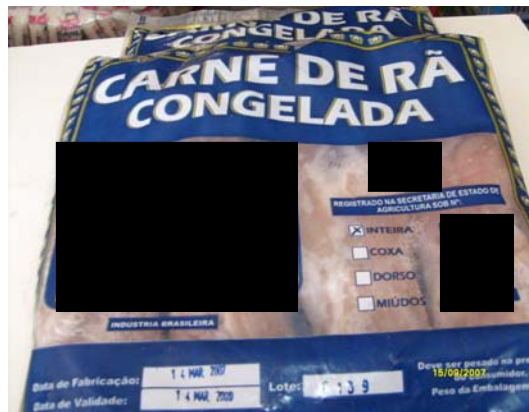


Figura 4. Representação da amostra adquirida para análise.

O processo de análise microbiológica foi iniciado após a obtenção das 30 amostras, transportadas e descongeladas em geladeira por “overnight” (6°C) em três grupos de dez e imediatamente analisadas.

As amostras acondicionadas por “overnight” foram levadas individualmente para a câmara asséptica após a sanificação das paredes, bancada e superfícies das embalagens com álcool etílico a 70%. As embalagens da carne de rã foram abertas e a carne fragmentada com o auxílio de instrumental esterilizado e flambado.

Foram pesadas 25 g da carne de rã (unidade analítica preconizada para alimentos com o mínimo de 250 g na embalagem), de forma asséptica, homogênea e aleatória, em balança digital (Marte® modelo AS2000C) e transferidas para o saco de “Stomacher”® esterilizado. Esse procedimento foi realizado duas vezes por embalagem, em seguida as subamostras foram identificadas e acondicionadas em geladeira.

3.3.4 Análises Bacteriológicas

Previamente ao início das análises diárias foi realizada a descontaminação das superfícies da câmara asséptica e do instrumental com álcool etílico 70%, identificado os materiais e realizada a lavagem das mãos com posterior antissepsia com álcool etílico 70%.

3.3.4.1 Enumeração de Coliformes Totais e Fecais

Para enumeração Coliformes Totais (CT) e Fecais (ou termotolerantes, CF), adotou-se a técnica preconizada pela IN nº 62 (BRASIL, 2003a), para alimentos de origem animal, porém não há padrões, destes micro-organismos, especificamente, para carnes de rã.

Para cada saco de “Stomacher”[®] contendo a subamostra (25 g de carne de rã), foi adicionado 225 mL de Solução Salina Peptonada 0,1% (SSP) e a mistura homogeneizada no aparelho “Stomacher”[®] (Seward, modelo 80) em velocidade média por dois minutos, obtendo a diluição inicial 10^{-1} .

As demais diluições foram preparadas retirando-se 1 mL da diluição 10^{-1} e vertendo em um tubo de ensaio contendo 9 mL da mesma solução, desta forma, obtendo-se a diluição 10^{-2} e para obtenção da última diluição (10^{-3}), retirou-se 1 mL da diluição 10^{-2} , vertendo tal alíquota em tubo de ensaio contendo 9 mL da referida solução.

Após o preparo das diluições foram utilizadas três séries de três tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato (CLS) (Merck[®] nº 10266) contendo em seu interior tubos de Durham invertidos para visualização do processo fermentativo.

Esta fase é chamada de teste presuntivo e baseia-se na inoculação da amostra em CLS, em que a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durham, produzido pela fermentação da lactose contida no meio. O CLS apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que confere um poder tamponante, impedindo a acidificação. A seletividade do meio se deve à presença do lauril sulfato de sódio, um agente surfactante aniônico que atua na membrana citoplasmática de micro-organismos Gram-positivos inibindo o seu crescimento (BRASIL, 2003a).

Com auxílio de uma pipeta graduada de 5 mL, retirou-se da maior diluição, 3 mL, vertendo 1 mL em cada tubo da diluição 10^{-3} no CLS, em sequência, retirou-se 3 mL da segunda maior diluição, vertendo 1 mL em cada tubo da segunda série no CLS, com o mesmo procedimento, retirou-se 3 mL da menor diluição, vertendo 1 mL em cada tubo da primeira série no tubo com CLS, sendo, em seguida, incubado em estufa bacteriológica (Thermolyne[®] modelo 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, presença de gás no interior do tubo de Durhan e, ou, efervescência quando o tubo era gentilmente agitado, devido à fermentação da lactose, causada pelo micro-organismo e conseqüente produção de ácido e gás, permanecendo o gás aprisionado no interior deste tubo. Nesta etapa encerra-se o teste presuntivo para CT e CF, anotando os tubos considerados positivos de cada diluição.

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 da alça de platina, padronizada de 3 mm de diâmetro, semeou-se em seguida para o Caldo Verde Brilhante Bile Lactose (VBBL) (Merck® nº 5454) – para CT; e para o Caldo *Escherichia coli* (EC) (Merck® nº 10765) – para CF.

Esta fase é chamada de teste confirmativo, onde a presença de gás nos tubos de Durhan do Caldo VBBL e do Caldo EC evidencia a fermentação da lactose presente no meio. O Caldo VBBL apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição dos micro-organismos Gram-positivos. Enquanto o caldo EC apresenta em sua composição uma mistura de fosfatos que lhe confere um poder tamponante, impedindo a sua acidificação. A seletividade do meio se deve à presença de sais biliares, responsáveis pela inibição dos micro-organismos Gram-positivos (BRASIL, 2003a).

Em seguida, os subcultivos do Caldo VBBL foram incubados na estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, seguido de mais 24 horas para os tubos considerados negativos. Enquanto os subcultivos do Caldo EC foram incubados no banho-maria com agitador (Polyscience®) a 44,5° a 45,5°C por 24 horas, seguido de mais 24 horas para os tubos considerados negativos, em ambos os casos, devido os fermentadores tardios da lactose.

Foram considerados positivos os tubos conforme anteriormente descrito. Registrando-se os tubos positivos de cada diluição a partir dos quais foi calculado o Número Mais Provável (NMP) de CT e CF por grama da amostra, conforme a tabela de NMP para três diluições com três tubos em cada diluição.

3.3.4.1.1 Esquema da enumeração de Coliformes Totais e Fecais



Amostra: 25 g de carne de rã-touro



Adicionar 225 mL de SSP 1%
homogeneizar no "Stomacher"

diluição 10⁻¹

1 mL

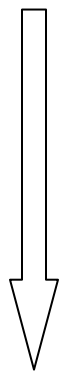


SSP 1% 9 mL
diluição 10⁻²



SSP 1% 9 mL
diluição 10⁻³

1 mL



Teste Presuntivo



CLS 10 mL
(37°C por 24 horas)



CLS 10 mL
(37°C por 24 horas)



CLS 10 mL
(37°C por 24 horas)

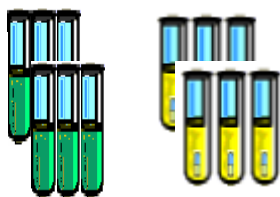
SOMENTE os tubos POSITIVOS → com turvamento do meio, presença de gás no interior do tubo de Durham e/ou efervescência quando o tubo era gentilmente agitado → foram registrados e

CT CF

CT CF

CT CF

Teste Confirmativo
para CT e CF



VBBL 37°C por 24 a 48 horas
EC 44,5° a 45,5°C



VBBL 37°C por 24 a 48 horas
EC 44,5° a 45,5°C



VBBL 37°C por 24 a 48 horas
EC 44,5° a 45,5°C

Foram considerados **POSITIVOS** os tubos conforme a etapa anterior, registrando-os de cada diluição

3.3.4.2 Contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva

Para a contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva adotou-se a técnica preconizada pela IN nº 62 (BRASIL, 2003a) para alimentos de origem animal. A resolução RDC nº 12 da ANVISA determina que a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva para carne de rã *in natura*, refrigerada ou congelada, seja de três classes, sendo a unidade amostral analisada classificada como aceitável, qualidade intermediária aceitável ou inaceitável, em função dos limites *m* (que separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável) e *M* (que separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável; e valores acima de *M* são inaceitáveis). E nesse caso, os valores de *m* e *M* são, respectivamente, 5×10^2 e 10^3 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama (BRASIL, 2001).

Da mesma subamostra que foi adicionada 225 mL de SSP 0,1% e a mistura homogeneizada no aparelho "Stomacher"[®] obtendo a diluição inicial 10^{-1} para enumeração de coliformes, foi utilizada para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva.

As demais diluições foram preparadas retirando-se 100 µL da diluição 10^{-1} e pipetando em um "ependorf" contendo 900 µL de SSP 0,1%, obtendo-se a diluição 10^{-2} e para obtenção da última diluição (10^{-3}), retirou-se 100 µL da diluição 10^{-2} , pipetando em outro "ependorf" contendo 900 µL da referida solução.

Após preparar o meio Ágar Baird-Parker (ABP) (Merck[®] nº 5406) foi adicionado telurito de potássio a 3,5% e solução de gema de ovo a 50%. Sobre a superfície da placa de Petri contendo o ABP foi semeado 100 µL de cada diluição e com o auxílio do bastão tipo "hockey" espalhou-se o inóculo cuidadosamente por toda a superfície do meio. A incubação ocorreu após total absorção da diluição no meio. As placas foram incubadas invertidas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 a 48 horas.

A inoculação em ABP evidencia a habilidade dos estafilococos crescerem na presença de 0,01 a 0,05% de telurito de potássio em combinação com 0,2 a 0,5 % de cloreto de lítio e 0,12 a 1,26% de glicina. Dessa forma o *S. aureus* reduz anaeróbia e aerobiamente o telurito de potássio, produzindo colônias pretas. A suplementação com solução de gema de ovo possibilita a verificação das atividades proteolítica e lipolítica do *S. aureus* por meio do aparecimento de um halo de

transparência e um de precipitação ao redor da colônia, respectivamente (BRASIL, 2003a).

As colônias típicas de *S. aureus* apresentaram-se: puntiformes, pretas, com halos transparentes, rodeadas por uma zona opaca, brilhantes e convexas. Excepcionalmente, espécies não lipolíticas produzem colônias sem halo de transparência e zona opaca ao seu redor (ibid.).

Para as provas complementares: da catalase, da coagulase e coloração de esfregaço pelo método de Gram, foram selecionadas cinco colônias, preferencialmente típicas. As colônias com características morfocoloniais e morfotintoriais sugestivas para *Staphylococcus* coagulase positiva foram repicadas com o auxílio de uma agulha de platina para o Meio Infusão Cérebro Coração (Caldo BHI) (Britania[®]) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas para obtenção de cultivos jovens (fase log), com o máximo de potencial imunogênico e patogênico, para realização das provas a seguir:

* Prova da Catalase:

A prova da catalase baseia-se na capacidade da enzima catalase em decompor o peróxido de hidrogênio, liberando água e oxigênio, o que é evidenciado por meio da formação de borbulhas (BRASIL, 2003a).

Com o auxílio de uma alça de platina foi retirada uma alíquota do cultivo em Caldo BHI recém incubado para o Ágar "Brain Heart Infusion" (Ágar BHI - nutriente) (Oxoid[®] CM nº 0375) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. No tubo com o cultivo em Ágar BHI foram colocadas algumas gotas de peróxido de hidrogênio 3% com auxílio da pipeta Pasteur. A formação instantânea de borbulhas indica prova da catalase positiva o *S. aureus* é catalase positivo.

* Prova da Coagulase:

A prova da coagulase baseia-se na comprovação da capacidade de coagular o plasma de coelho pela ação da enzima coagulase produzida pelo micro-organismo, transformando o fibrinogênio em fibrina. A formação de um coágulo grande e organizado ou a coagulação total foram considerados resultados positivos

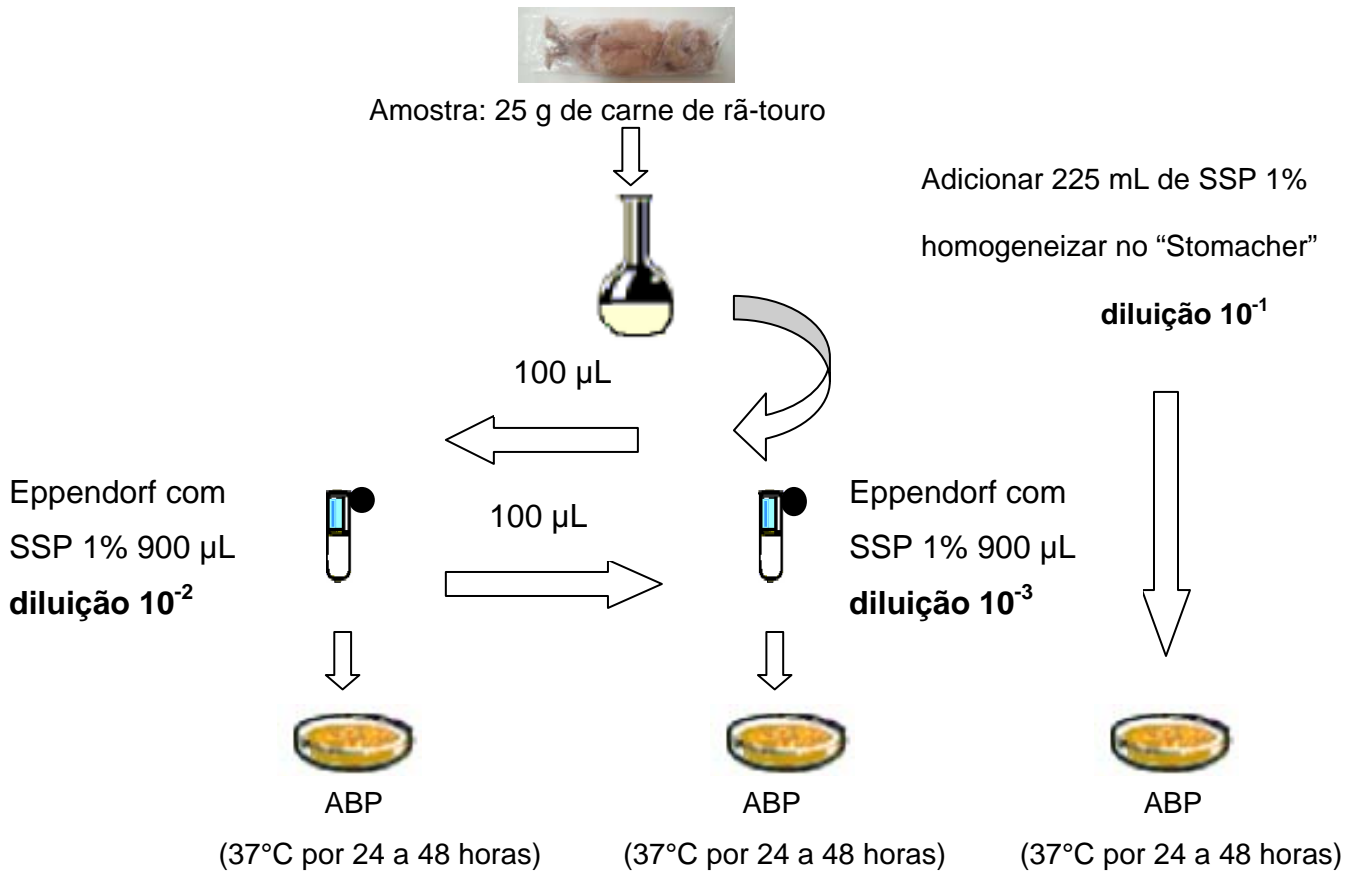
para a prova; já a formação de coágulo pequeno e desorganizado ou organizado, foi avaliada em conjunto com a prova da catalase e coloração pelo método de Gram (BRASIL, 2003a).

Com o auxílio de um pipetador foi retirado 200 µL do cultivo em Caldo BHI recém incubado para um tubo estéril contendo 200 µL de plasma de coelho e incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 6 horas. O plasma de coelho utilizado foi o da marca Coagu-plasma Laborclin®. O *S. aureus* é coagulase positivo.

* Coloração do esfregaço pelo método de Gram:

Em Brasil (2003a) a coloração do esfregaço pelo método de Gram foi baseada na verificação das características morfológicas e morfotintoriais do micro-organismo. Os cocos Gram-positivos que se dispõem em cachos irregulares, cocos isolados, aos pares e, ou, em tétrades, indicam a possível presença de estafilococos.

3.3.4.2.1 Esquema da contagem de *Staphylococcus Coagulase Positiva*



Foram contadas as placas com 15 a 150 colônias, preferencialmente TÍPICAS de *S. aureus*: puntiformes, pretas, com halos transparentes, rodeadas por zona opaca, brilhantes e convexas; e excepcionalmente as ATÍPICAS, sem halo.

Coloração do esfregaço pelo método de Gram



Cocos Gram +

Prova da Coagulase

200 µL Caldo BHI
+
200 µL Plasma de coelho
(37°C por 6 horas)
= COÁGULO



Prova da Catalase

Caldo BHI
(37°C por 24 horas)



Ágar BHI
(37°C por 24 horas)



+ 3 gotas H₂O₂ 3%
= BORBULHAS

3.3.4.3 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. adotou-se a técnica preconizada pela IN nº 62 (BRASIL, 2003a) para alimentos de origem animal. Na resolução RDC nº 12 da ANVISA há indicação da ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de carne de rã *in natura*, refrigerada ou congelada (BRASIL, 2001).

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi dividida nas etapas de: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo diferencial, triagem bioquímica e sorologia.

* Pré-enriquecimento:

Para cada saco de “Stomacher”[®] contendo a subamostra (25 g de carne de rã) foi adicionado 225 mL de Água Peptonada 1% Tamponada (APT) (Merck[®] nº 6579) sendo homogeneizadas no aparelho “Stomacher”[®] em velocidade média por dois minutos e foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

A APT favorece a manutenção do pH, evitando que as bactérias acompanhantes acidifiquem o meio, prejudicando a recuperação das células de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2003a).

* Enriquecimento seletivo:

Com o auxílio do pipetador foi transferido 1 mL do cultivo em APT para um tubo com 10 mL de Caldo Selenito-Cistina (CSC) (Merck[®] nº 7709) e 0,1 mL para um tubo com 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (CRV) (Merck[®] nº 7700). Sendo posteriormente homogeneizados e incubados, o CSC em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, enquanto o CRV em estufa bacteriológica a 42°C por 24 horas.

O enriquecimento seletivo baseia-se na utilização de meios que contêm substâncias de ação impediente do crescimento para a maioria dos microorganismos interferentes e na incubação em temperatura seletiva. O enriquecimento seletivo de *Salmonella* spp. se faz obrigatoriamente nos meios líquidos seletivos, CRV e CSC. No CRV, a presença de verde malaquita e de cloreto de magnésio, associada à temperatura, atua como agentes seletivos da microbiota acompanhante,

enquanto a presença de peptona de farinha de soja estimula o crescimento de *Salmonella* spp. No CSC, o agente inibidor selenito de sódio atua inibindo os coliformes e *Enterococcus* spp. (BRASIL, 2003a).

* Plaqueamento seletivo diferencial:

O material enriquecido nos meios CRV e CSC foi semeado por esgotamento em placas de Petri contendo meios de alta (cromogênico), média e baixa seletividade, respectivamente: Ágar *Salmonella* Diferencial (RAM) (HiMedia[®] n° M-1078); Ágar Entérico Hektoen (HEK) (Merck[®] n° 11681) e Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (Ágar BPLS) (Merck[®] n° 7232). Sendo posteriormente incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 a 48 horas.

O plaqueamento seletivo diferencial baseia-se na seleção de colônias de *Salmonella* spp. em, pelo menos, dois meios sólidos: o BPLS e obrigatoriamente outro ágar de maior impediência. No BPLS, a novobiocina adicionada visa principalmente a inibição de *Proteus* spp. Esse meio apresenta em sua composição bile bovina e um corante derivado do trifenilmetano (verde brilhante), responsáveis pela inibição de micro-organismos Gram-positivos. No RAM, a diferenciação entre *Salmonella* spp. e outros micro-organismos é promovida pela presença de propilenoglicol e de um cromógeno que evidencia a hidrólise da beta-galactosidase (BRASIL, 2003a).

O HEK quando comparado à outros meios, tem a vantagem de permitir o crescimento da *Salmonella* spp. e da *Shigella* spp., mas ao mesmo tempo resguarda a adequada inibição dos micro-organismos acompanhantes. O HEK possui dois indicadores, o bromotimol e o ácido fucsínico, que diferencia os micro-organismos lactose-positivo dos lactose-negativo pela coloração das colônias. Algumas salmonelas reduzem combinação do tiosulfato de sódio, presente no meio e formam um composto que reage com sal férrico, este é evidenciado pelo indicador ácido sulfídrico (H₂S)-positivo, originando sulfeto de ferro de coloração preta. Os sais biliares são responsáveis pela inibição dos micro-organismos acompanhantes (MERCK, 2000).

* Triagem bioquímica:

As placas de Petri com comportamento bioquímico característico para *Salmonella* spp. foram repicadas (três colônias de cada plaqueamento) para o Ágar Três Açúcares e Ferro (TSI) (MicroMed® nº 2051) e Ágar Lisina Ferro (LIA) (Merck® nº 11640), dando início à etapa de triagem bioquímica das colônias típicas de *Salmonella* spp., na qual utiliza-se meios indicativos não seletivos. Após o repique (picada profunda e estriamento na superfície inclinada do bisel com auxílio de agulha de platina), os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

No Ágar TSI estão presentes: glicose (1 g/L), lactose (10 g/L) e sacarose (10 g/L). Como a glicose é um monossacarídeo e está em baixa concentração, será rapidamente fermentada anaerobiamente, formando ácido no fundo do tubo, o que torna o meio amarelo pela viragem do indicador vermelho de fenol (todos os membros da família *Enterobacteriaceae* fermentam a glicose com produção de ácido). A fermentação aeróbia da glicose, que ocorre na superfície do bisel, resulta em ácido pirúvico, que é posteriormente degradado a gás carbônico (CO₂) e água. A grande maioria das salmonelas não fermenta a sacarose e a lactose, não provocando alterações no meio TSI. Como a fonte de carbono utilizável (glicose) é rapidamente esgotada, a salmonela passa a degradar aerobiamente o substrato protéico do meio, produzindo amoníaco (NH₃), o que confere ao meio um pH alcalino, modificando a coloração do bisel para rosa intenso. A maioria das salmonelas apresenta no TSI as seguintes reações: ácido na base, com ou sem produção de gás; alcalino ou inalterado no bisel; com ou sem produção de H₂S (BRASIL, 2003a).

No Ágar LIA pode ser observada a descarboxilação da lisina pela alcalinização do meio, o que é demonstrado pela não alteração de cor do indicador presente. A atividade da enzima lisina descarboxilase é dependente do pH, sendo mais ativa em pH abaixo de 5,5. A acidificação do meio é obtida pela fermentação da glicose presente. Nessa etapa do processo ocorre a viragem do indicador púrpura de bromocresol, de violeta para amarelo. Na condição anaeróbia obtida na base Ágar LIA, todo o oxigênio não combinado é consumido pelo micro-organismo presente na fase inicial de crescimento. A descarboxilação da lisina que ocorre posteriormente,

resulta na produção de uma diamina (cadaverina) e CO_2 , que conferem ao meio características de alcalinidade e nova viragem da cor do indicador, que passa de amarelo para violeta. A diamina é estável quando produzida em condições anaeróbias. A maioria das salmonelas é capaz de produzir lisina descarboxilase, apenas 4% das cepas de salmonela não descarboxilam a lisina (BRASIL, 2003a).

Como o comportamento bioquímico nos meios Ágar TSI e LIA são semelhantes para *Salmonella* spp. e *Proteus* spp. são indicadas novas provas bioquímicas.

Os cultivos em Ágar TSI e LIA com comportamentos bioquímicos característicos para *Salmonella* spp. foram semeados em caldo BHI (Britania[®]) e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, sendo posteriormente submetidos às provas bioquímicas complementares.

A partir do cultivo em caldo BHI foi retirada uma alíquota com auxílio de agulha de platina 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 a profundidade de 0,5 cm. O material inoculado foi incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

A motilidade é caracterizada pela difusão do crescimento por todo o meio. Se for restrito à linha de semeadura, indica que o micro-organismo é imóvel. A maioria das salmonelas apresenta motilidade positiva. O meio SIM é o meio mais indicado para a verificação da produção de H_2S . O H_2S é um gás incolor produzido pelo micro-organismo em teste pela redução do tiosulfato presente no meio. A revelação da presença de H_2S se realiza por meio da reação do H_2S com o citrato de ferro e amônio (presente no meio), formando um precipitado negro insolúvel. A maioria das salmonelas produz H_2S .

Após a leitura da motilidade e da produção de H_2S adicionou-se algumas gotas de reativo de Kovac's aos tubos para verificar se houve produção de indol. A oxidação do triptofano presente no meio SIM leva à formação de três principais compostos: indol, escatol e indolacetato. A adição do reativo de Kovac's resulta na formação de um anel vermelho, resultante da reação entre o indol e o dimetilaminobenzaldeído contido nesse reativo. Quase a totalidade das salmonelas não produz indol (BRASIL, 2003a).

O Ágar Fenilalanina foi preparado conforme o Anexo IX (Meios de cultura) da IN nº 62 respeitando a proporção indicada e o volume necessário. Utilizou-se a seguinte fórmula:

Extrato de Levedura (Oxoid[®] nº LP -0021) – 3 g;
Cloreto de Sódio (Reagen[®]) – 5 g;
DL-Fenilalanina (Inlab[®]) – 2 g;
Fosfato de Sódio Monobásico (Reagen[®] nº 10065) – 1 g;
Ágar - Ágar (Merck[®] nº 1.01614) – 15 g;
Água Destilada – 1000 mL.

Para realização do teste da fenilalanina foi retirada uma nova alíquota do cultivo em caldo BHI com auxílio de alça de platina, o qual foi distribuído em toda superfície inclinada do Ágar Fenilalanina e incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Após retirar o inóculo da estufa bacteriológica foi adicionado 5 gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 10%.

A adição do cloreto férrico a 10% tem como finalidade observar se o micro-organismo 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 alteração da coloração da cultura na superfície do bisel para verde indica reação de desaminação da fenilalanina e quando não produz a reação o meio permanece na coloração amarela original do reativo cloreto férrico. A *Salmonella* spp. não desamina a fenilalanina (BRASIL, 2003a).

Para realização do teste da urease foi retirada uma nova alíquota do cultivo em caldo BHI com auxílio de alça de platina, semeado maciçamente em Caldo Uréia (Merck[®] nº 8483) e incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

Ao retirar o cultivo da estufa foi observada a coloração do meio. A manutenção da cor inicial do meio indica que não ocorreu hidrólise da uréia. A alteração para rosa intenso é indicativa de alcalinização do meio devido à ação da urease sobre a uréia. A *Salmonella* spp. não produz urease (BRASIL, 2003a).

* Sorologia:

Para caracterização sorológica foi utilizado o Soro *Salmonella* Polivalente Somático da Probac do Brasil[®] que contém anticorpos contra antígenos O das salmonelas dos grupos A, B, C, D e E.

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. Foram consideradas positivas as reações de aglutinação ocorridas no intervalo de dois minutos.

A partir de culturas recentes em caldo BHI repicou-se para o Ágar BHI inclinado com estria superficial e incubado em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A partir do crescimento neste meio foi adicionado 2 mL de Solução Fisiológica Estéril 0,85%, para obtenção de uma suspensão bacteriana espessa.

Em uma placa de aglutinação (Huddleson) 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 e soro se deslocasse fácil e continuamente, durante um a dois minutos. A reação positiva apresenta aglutinação somente na mistura cultivo e anti-soro; na reação negativa há ausência de aglutinação em ambas as misturas e na reação não específica ocorre aglutinação em ambas as misturas devendo ser novamente reisoladas em ágar não-seletivo e submetidas à reação sorológica (BRASIL, 2003a).

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, morfotintoriais e morfocoloniais característicos, confirmados com a aglutinação dentro do tempo previsto, foram consideradas pertencentes ao gênero *Salmonella*.

3.3.4.3.1 Esquema da pesquisa de *Salmonella* spp.



Amostra: 25 g de carne de rã-touro



Adicionar 225 mL de APT

→ homogeneizar no “Stomacher”

Pré-enriquecimento (37°C por 24 horas)

Enriquecimento seletivo



10mL

CRV

(42°C por 24 horas)



10mL

CSC

(37°C por 24 horas)



HEK BPLS RAM HEK BPLS RAM

(37°C por 24 horas)

Plaqueamento seletivo diferencial



UFC's Típicas



Provas bioquímicas e sorologia

Confirmação presuntiva

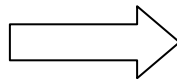


TSI

(37°C por 24 horas)



LIA

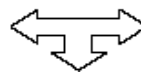


Caldo ou Ágar BHI

(37°C por 24 horas)



Teste Sorológico
Aglutinação +



Características Fenotípicas
Fenilalanina –
Uréia –
Indol +
Motilidade +

Esfregaço em Lâmina
Bastonetes Gram –

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FORMA DE APRESENTAÇÃO DA CARNE DE RÃ

Foi constatado nos pontos de vendas visitados, que as diferentes embalagens de carne de rã disponíveis para comercialização pertenciam a três marcas distintas, uma sob a fiscalização do SIF e as outras duas do SIE. Os mercados varejistas do município do Rio de Janeiro (RJ) foram escolhidos aleatoriamente: 13 no Centro, 35 na Zona Sul, 22 na Zona Oeste e 24 na Zona Norte.

Na tabela 1 consta a relação dos itens obrigatórios na rotulagem de acordo com a legislação brasileira, destacando as marcas A, B e C observadas nos comércios varejistas. A maioria dos itens da rotulagem dos produtos estava em conformidade, exceto: a identificação do lote (onde a marca B não estava em conformidade); as instruções sobre o preparo e uso do produto (onde apenas a marca B estava em conformidade) e a lista de ingredientes não se aplica para carne *in natura*.

Todas as carcaças de rã comercializadas se apresentavam inteiras e congeladas a -20°C , embaladas individualmente com saco de polietileno e o conjunto embalado com polietileno selado a quente, com aproximadamente 500 gramas de peso líquido.

A marca B continha peso líquido fixo de 550 gramas, enquanto as marcas A e C deveriam ser pesadas na presença do consumidor, mas esta conduta só foi presenciada em dois mercados da mesma rede e em 14 lojas especializadas. O peso líquido das marcas A e C oscilaram entre 472 g e 543 g (média de 507 g). O tamanho das carcaças de rãs das marcas A e B eram maiores e mais uniformes que as da marca C.

Os preços oscilaram entre R\$ 18,60 e R\$ 42,30 por embalagem (média de R\$ 30,45 por 500 g). Não foi observada diferença entre os preços, a localidade e o comércio, mas as lojas especializadas (por exemplo: açougues e boutiques de carnes) apresentaram os maiores preços.

Os preços das carnes de rã compradas para esta pesquisa foram bem mais elevados que os relatados por Mathias (2004), R\$ 18,00 a R\$ 29,00 por quilo (média de R\$ 23,50/kg), na região metropolitana do estado do RJ e por Weichert (2007), R\$ 59,81 a R\$ 24,00 por quilo (média de R\$ 38,75/kg), na cidade do Rio de Janeiro e Niterói (RJ).

Mathias (2004) e Weichert (2007) destacaram os seguintes problemas para a comercialização da carne rã nos mercados do estado do RJ: fornecimento irregular por parte dos produtores; tamanho inadequado; falta de hábito do consumidor (sendo bastante associado às pessoas com problemas de saúde ou debilitadas); elevado preço e resistência do consumidor à percepção estética.

Tabela 1. Relação dos itens obrigatórios na rotulagem de acordo com a legislação brasileira.

Marcas	A	B	C	Total
Produtos	41	58	17	116
Data de fabricação	✓	✓	✓	100%
Prazo de validade	✓	✓	✓	100%
Identificação do lote	✓	X	✓	66,7%
Denominação de venda do alimento	✓	✓	✓	100%
Identificação da origem	✓	✓	✓	100%
Nome ou razão social	✓	✓	✓	100%
Conteúdos líquidos	✓	✓	✓	100%
Carimbo oficial da Inspeção	✓	✓	✓	100%
Categoria do estabelecimento	✓	✓	✓	100%
CNPJ	✓	✓	✓	100%
Rotulagem nutricional	✓	✓	✓	100%
Conservação do produto	✓	✓	✓	100%
Instruções sobre o preparo e uso do produto	X	✓	X	33,3%
Lista de ingredientes	NA	NA	NA	NA

✓ - presente X - ausente NA - não se aplica

4.2 FREQUÊNCIA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DA CARNE DE RÃ

* *Salmonella* spp.

A frequência de isolamento de *Salmonella* spp. foi de 10%, este valor representa o nível de contaminação do produto.

Na tabela 2 consta a positividade para *Salmonella* spp. encontrada nas amostras analisadas, onde três amostras da marca A foram positivas, representando 27,27% do total de amostras da marca A, correspondendo a 10% do total de amostras analisadas.

Tabela 2. Positividade para *Salmonella* spp.

Marcas	Número de amostras	Número de amostras Positivas	Percentual de Positividade
A	11	3	27,27%
B	13	0	0,00%
C	6	0	0,00%
Total	30	3	10,00%

Na resolução RDC nº 12 da ANVISA, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, há citação de que a *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 gramas de carne de rã *in natura*, refrigerada ou congelada (BRASIL, 2001), portanto três amostras das 30 analisadas estão sem conformidades com a legislação, impróprias para o consumo.

Silva e Oliveira (1994; 1997) avaliaram 160 amostras de carne de rã congeladas, 80 provenientes de abatedouro industrial (com serviço de inspeção) e 80 de abatedouro doméstico (sem serviço de inspeção) e observaram ausência em 100% das amostras do abatedouro industrial e presença de *Salmonella* spp. em 17 amostras do abatedouro doméstico (21,2%), não sendo condizente com o percentual de salmonelas encontradas nessa pesquisa.

O percentual de amostras com *Salmonella* spp. neste estudo foi menor que os percentuais encontrados pelos autores mencionados a seguir. Rodrigues et al. (1994) pesquisaram 30 amostras de carne de rã congelada proveniente do comércio de Niterói (RJ) e detectaram em 29 amostras (97%) a presença de *Salmonella* spp.

Yde et al. (1985) descreveram a presença de *Salmonella* spp. em 53 das 75 amostras analisadas, logo, 71%. Enquanto Shrivastava (1978) encontrou *Salmonella* spp. em 40% das 325 amostras de carnes de rã congeladas estudadas.

Apesar de ter sido verificada a diminuição do nível de contaminação por *Salmonella* spp. nas carnes de rãs, deve-se ressaltar que a legislação determina ausência em 25 g do produto para este ser próprio ao consumo. Apesar de diversos autores considerarem comum a presença de salmonela em carne crua, pois esta pode fazer parte da microbiota desta matéria-prima, deve-se levar em consideração as condições higiênico-sanitárias do ranário, do estabelecimento industrial, comercial e da manipulação do alimento antes do consumo.

Ressalta-se que das 23 estirpes isoladas *Salmonella* spp., no enriquecimento seletivo, 17 foram provenientes do CRV e 6 do CSC; no plaqueamento seletivo diferencial, 20 foram provenientes do HEK e 3 do RAM; e na confirmação presuntiva, 13 foram provenientes do LIA e 10 do TSI. Corroborando com Andrews et al. (1977), que observaram ao comparar diferentes métodos de isolamento de salmonela que o CSC e o HEK eram bons meios de cultura para se isolar essa bactéria.

* *Staphylococcus* coagulase positiva

A frequência do gênero *Staphylococcus* coagulase positiva foi considerada elevada nesta pesquisa (53,33%), este micro-organismo é capaz de produzir toxinas termoestáveis no alimento.

Na tabela 3 consta o número e percentual de amostras aptas para consumo segundo contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva. De 30 amostras analisadas, 53,33% foram impróprias para consumo, uma vez que dez amostras da marca A e seis da marca B apresentaram valores superiores a 10^3 UFC por grama.

A resolução RDC nº 12 da ANVISA determina que a contagem de *S. aureus* coagulase positiva para carne de rã *in natura*, refrigerada ou congelada, seja de três classes (tipos de plano de amostragem), ou seja, a unidade amostral a ser analisada pode ser classificada como aceitável, qualidade intermediária aceitável ou inaceitável, em função dos limites m (que separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável) e M (que separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável; e valores acima de M são inaceitáveis). E

nesse caso, os valores de m e M são, respectivamente, 5×10^2 e 10^3 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama (BRASIL, 2001).

Tabela 3. Número e percentual de amostras aptas para consumo segundo contagem de *Staphylococcus* Coagulase Positiva.

Aptidão	Todas	Marca A n (%)	Marca B n (%)	Marca C n (%)	Total
Apta para consumo	14	1 (9,09%)	7 (53,85%)	6 (100,00%)	46,67%
Imprópria para consumo	16	10 (90,91%)	6 (46,15%)	0 (0,00%)	53,33%
Total	30	11	13	6	100,00%

O percentual de amostras com *S. aureus* coagulase positiva nesta pesquisa foi maior que os percentuais encontrados por outros autores. Rodrigues et al. (1994), os quais detectaram contaminação por *S. aureus* em 4 amostras, ou seja, 13%. Yde et al. (1985) encontraram *S. aureus* em 33 das 75 amostras analisadas, logo, 44%. Silva e Oliveira (1994; 1997) observaram contagens de até $1,0 \times 10^1$ UFC de *S. aureus* (26,2%) nas amostras do abatedouro industrial e contagens entre $1,0 \times 10^1$ UFC a $8,7 \times 10^2$ UFC (33,7%) nas amostras do abatedouro doméstico.

A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva no alimento é preocupante, pois a pré-formação de toxinas, conhecidas como enterotoxinas ocasiona perigo em potencial de intoxicação ao ingestor. A transmissão dessa bactéria está intrinsecamente relacionada à manipulação dos alimentos sem os devidos cuidados higiênico-sanitários, portanto essa conduta deve ser supervisionada rigorosamente conforme citam os autores, Bourgeois et al. (1994), Forsythe (2002), Franco; Landgraf (2003) e Jay (2005).

* Coliformes

Foi verificada a frequência de 70% de coliformes totais (apesar dos baixos valores predominarem) e praticamente nenhum coliforme fecal.

Na tabela 4 observa-se o número e percentual de amostras com coliformes totais (CT). Apenas 30% das 30 amostras analisadas apresentaram ausência de CT; 53,33% tiveram valores menores que 100 NMP; 13,33% tiveram valores entre 100 e 1.000 NMP e 3,33% tiveram valores maiores que 1.000 NMP.

Tabela 4. Número e percentual de amostras com Coliformes Totais.

CT – NMP*/grama	Todas	Marca A	Marca B	Marca C	Total
Ausência	9	0	5	4	30,00%
Menor que 100 NMP	16	6	8	2	53,33%
Entre 100 e 1.000 NMP	4	4	0	0	13,33%
Maior que 1.000 NMP	1	1	0	0	3,33%
Total	30	11	13	6	100,00%

*CT - NMP – Coliformes Totais - Número Mais Provável.

Embora na resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001) não haja indicação padrão de identidade e qualidade para presença de CT e CF em carnes de rãs *in natura*, refrigerada ou congelada, é importante verificar a quantidade desses micro-organismos nos alimentos, pois além de indicarem a contaminação fecal, também demonstram possíveis contaminações pós-processamento e as condições higiênicas do processo industrial (FORSYTHE, 2002; FRANCO; KORNACKI; JOHNSON, 2001; LANDGRAF, 2003).

Os valores encontrados corroboram com Corrêa (1988), que encontrou valores superiores a 1.000 NMP/g em amostras de carne de rã congeladas por 182 dias, porém não discriminou a quantidade percentual.

O percentual de amostras com CT nesta pesquisa foi menor que o encontrado por Rodrigues et al. (1994), os quais detectaram contaminação por CT em 100% (média de 1.115 NMP/g).

Cento e setenta amostras de carne de rã analisadas por Loaliza (1996), apresentaram quantidades de CT inferiores às observadas nesta pesquisa. Ao analisar as amostras ao longo da estocagem sob congelamento a – 18°C, constatou no dia zero 500 NMP/g; no 30º dia 300 NMP/g; no 150º dia 76 NMP/g e no 180º dia 9 NMP/g.

Na tabela 5 é possível verificar que 93,33% das 30 amostras analisadas apresentaram ausência de coliformes fecais (CF); apenas a marca B apresentou duas amostras com 4 NMP de CF.

Tabela 5. Número e percentual de amostras com Coliformes Fecais.

CF – NMP*/grama	Todas	Marca A n (%)	Marca B n (%)	Marca C n (%)	Total
Ausência	28	11 (100,00%)	11 (84,62%)	6 (100,00%)	93,33%
4 NMP	2	0 (0,00%)	2 (15,38%)	0 (0,00%)	6,67%
Total	30	11 (100,00%)	13 (100,00%)	6 (100,00%)	100,00%

*CF - NMP – Coliformes Fecais - Número Mais Provável.

n - número de amostras (%) - percentual

Novamente os valores encontrados corroboram com os achados de Corrêa (1988), que não detectou a presença de CF em carne de rã estocada sob congelamento por 182 dias.

Loaiza (1996), que pesquisou CF ao longo da estocagem sob congelamento a -18°C e constatou no dia zero, 197 NMP/g; no 30^o dia, 8 NMP/g; no 60^o dia, 8 NMP/g; no 90^o dia, 3 NMP/g; no 150^o dia, 7 NMP/g e no 180^o dia, menos que 1 NMP/g. Exceto no dia zero, os valores foram baixos, semelhante ao valor encontrado nesse estudo. Enquanto, Rodrigues et al. (1994), relataram a contaminação por CF em 83% (média de 506 NMP/g) e Yde et al. (1985) observaram *E. coli* em 24 das 75 amostras analisadas, logo, 32%.

Bourgeois et al. (1994), Jay (2005) e Ordóñez et al. (2005b) são enfáticos em relatar que o congelamento afeta de várias maneiras os micro-organismos, pois além da queda da temperatura reduzir a velocidade de multiplicação, a transformação da água em gelo diminui a quantidade de água livre disponível para desenvolverem-se. Geralmente as bactérias Gram-negativas são mais sensíveis ao congelamento do que as Gram-positivas, entretanto, se a microbiota inicial for elevada no momento do congelamento, continuará sendo depois do armazenamento e descongelamento.

* Relação entre os micro-organismos pesquisados

Os resultados das análises bacteriológicas em carne de rã-touro congelada estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6. Resultado das análises bacteriológicas em carne de rã-touro congelada, comercializada no município do Rio de Janeiro. (continua)

Amostras	<i>Salmonella</i> spp. (em 25 g da amostral)	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	Coliformes Totais	Coliformes Fecais
1	-	4,3 x 10 ³ UFC (T)	4 NMP/g	----
2	-	6,1 x 10 ³ UFC (T)	15 NMP/g	----
3	-	----	----	----
4	-	----	----	----
5	-	----	20 NMP/g	----
6	-	1,0 x 10 ² UFC (A)	9 NMP/g	----
7	-	----	----	----
8	-	----	----	----
9	-	----	11 NMP/g	----
10	-	1,0 x 10 ² UFC (A)	14 NMP/g	----
11	-	----	----	----
12	-	----	----	----
13	-	1,0 x 10 ³ UFC (T)	----	----
14	-	3,4 x 10 ⁴ UFC (T)	43 NMP/g	----
15	-	1,0 x 10 ² UFC (A)	----	----
16	+	1,8 x 10 ⁴ UFC (T)	120 NMP/g	----
17	-	2,0 x 10 ³ UFC (T)	----	----
18	-	3,4 x 10 ⁴ UFC (T)	460 NMP/g	----
19	+	3,8 x 10 ³ UFC (T)	210 NMP/g	----

Tabela 6. Resultado das análises bacteriológicas em carne de rã-touro congelada, comercializada no município do Rio de Janeiro. (continuação)

20	-	$1,0 \times 10^4$ UFC (T)	15 NMP/g	----
21	-	$1,0 \times 10^2$ UFC (T)	21 NMP/g	----
22	-	$3,0 \times 10^3$ UFC (T)	15 NMP/g	----
23	-	$1,0 \times 10^2$ UFC (T)	4 NMP/g	----
24	+	$4,2 \times 10^3$ UFC (T)	460 NMP/g	----
25	-	$1,0 \times 10^2$ UFC (T)	43 NMP/g	----
26	-	$5,0 \times 10^2$ UFC (T)	21 NMP/g	----
27	-	$1,2 \times 10^3$ UFC (T)	9 NMP/g	----
28	-	$7,0 \times 10^3$ UFC (T)	> 1100 NMP/g	----
29	-	$1,0 \times 10^2$ UFC (T)	43 NMP/g	4 NMP/g
30	-	$6,0 \times 10^3$ UFC (T)	35 NMP/g	4 NMP/g

- Negativo + Positivo (T) Típicas (A) Atípicas ---- Não houve crescimento

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- A presença de *Salmonella* spp. na carne de rã foi relativamente baixa, mas a legislação brasileira preconiza ausência em 25 g do produto, portanto esse resultado serve de alerta para os órgãos competentes de fiscalização, às indústrias e os consumidores, pois este patógeno é um importante causador de infecções alimentares;
- A combinação entre os meios de enriquecimento seletivo e plaqueamento seletivo diferencial para o isolamento de *Salmonella* spp., CSC e o HEK, foi a mais eficaz;
- A presença de *Staphylococcus* Coagulase Positiva acima dos valores permitidos na legislação brasileira foi alta, evidenciando um perigo em potencial da produção de enterotoxinas e, conseqüentemente, aumentando o risco de quadros de intoxicação alimentar;
- Apesar da legislação nacional não possuir padrão qualitativo e, ou, quantitativo para Coliformes Totais e Fecais para carne de rã, a presença desta microbiota indicou a possível deficiência higiênico-sanitária no processamento tecnológico, o que pode colocar em risco a saúde dos consumidores, apesar dos baixos valores encontrados.

6 SUGESTÕES

De acordo com as observações expostas, sugere-se:

- Que sejam realizadas maior número de pesquisas para avaliação e caracterização da carne de rã, pois há poucos trabalhos na área;
- Que baseado nas pesquisas, seja definido oficialmente o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne de Rã-Touro *In Natura*, Fresca e Congelada;
- Que os funcionários da cadeia produtiva de carne de rã sejam capacitados regularmente quanto às BPF e que sejam rigorosamente supervisionados, para que a microbiota enumerada, contada, isolada e identificada no presente trabalho, não esteja presente com frequência em amostras comercializadas, o que pode favorecer a ocorrência de quadros nosológicos aos consumidores e se tornar um problema regional, nacional e, até mesmo, internacional, tendo em vista o consumo da carne de rã como alimento alternativo em dietas especiais (sobretudo para crianças, idosos e imunocomprometidos), não só no Brasil, mas como em outros países.
- Que a combinação entre os meios de enriquecimento seletivo e plaqueamento seletivo diferencial para a melhor eficácia do isolamento de *Salmonella* spp. seja, respectivamente, CSC e o HEK;
- Que a carne de rã comercializada no município do Rio de Janeiro precisa de pequenos ajustes na rotulagem e o comércio deve respeitar a pesagem dos produtos na presença do consumidor (quando for o caso). São necessárias

estratégias para reduzir o índice de rejeição dos consumidores pelo aspecto da carcaça de rã inteira, logo, novas formas de apresentação. Além de intensificar o “marketing” do produto para que o consumidor conheça as qualidades nutricionais da carne de rã, como também baratear os preços, viabilizando assim, a compra por todas as classes de consumidores.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, A. M. Diagnóstico e caracterização do setor produtivo: região do Estado do Rio de Janeiro. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 34, p. 61-65, nov. 2003.

_____. Ranicultura no RJ. *Jornal CRMV-RJ*, Ano XXII, nº 207, p.7, out. 2008.

ANDREWS, W. H.; WILSON, C. R. POELMA, P. L.; ROMERO, A. Comparison of methods for the isolation of Salmonella from imported frog legs. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 65-68. jan. 1977.

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.

BASTOS, R. P.; MOTTA, J. A. O.; LIMA, L. P.; GUIMARÃES, L. D. A. *Anfíbios da Floresta Nacional de Silvânia, Estado de Goiás*. Goiânia: R. P. Bastos. p.57-59. 2003.

BERNARDI, N. O código internacional de nomenclatura zoológica adotado pelo XV Congresso Internacional de Zoologia, Londres, jul. 1958. In: PAPAVERO, N. *Fundamentos práticos de taxonomia zoológica*. 2ª ed., São Paulo, USP, p.189 - 264, 1994.

BEZERRA, J. A. *Ranicultura: Salto de qualidade*. Globo Rural On Line. Disponível em: <<http://globo.com/barra.asp?d=/edic/189/rep.htm>>. Acesso em: 23 de junho de 2006.

BOURGEOIS, C. M.; MESCLE, J. F.; ZUCCA, J. *Microbiologia alimentaria: aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria*. Vol.I. Zaragoza: Acribia, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)*. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelos Decretos nº 1.255, de 25 de junho de 1962, nº 1.236, de 2 de setembro de 1994, e nº 1.812, de 8 de fevereiro de 1996. p. 11.555, 5 de jun. 1997. Seção 1.

_____. _____. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. *Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.14, 18 set. 2003a. Seção 1.

_____. _____. Instrução Normativa nº 22, de 24 de novembro de 2005. *Regulamento Técnico para Rotulagem de Produtos de Origem Animal Embalado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, p.15, 25 nov. 2005. Seção 1.

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

_____. _____. _____. RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. *Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 26 dez. 2003b.

BRUENING, S. *Rana catesbeiana* - North American bullfrog. 2002. The Animal Diversity Web (online). University of Michigan. Disponível em: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rana_catesbeiana.html>. Acesso em: 21 de novembro de 2008.

CAFFER, M. I; EIGHER, T. *Salmonella enteritidis* in Argentina. *Internacional Journal Food Microbiology*, v.21, p.15-19, 1994.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE. *Staphylococcus aureus e intoxicação alimentar*. Março de 2003. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br>>. Acesso em: 13 de dezembro de 2008.

CHRISTIAN, J. H. B. Microbiological criteria for foods. Summary of recommendations of FAO/WHO expert consultation and working groups. 1975-1981, p. 26 - 27. *International Association of Microbiological Societies, Division of Food Research*, CSIRO, Australia. 1981.

CODEX ALIMENTARIUS. Código internacional recomendado de practices de hygiene para la elaboracion de ancas de Rana. CAC/RCP 30-1983. Rome, FAO, *Codex Alimentarius Commission*, 1983.

CORRÊA, A. L. S. *Avaliação composicional de diferentes espécies de rãs e efeitos do armazenamento a - 18°C sobre as frações protéicas e lipídicas do músculo de rã touro (Rana catesbeiana)*, 1988, 123 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1988.

COSTA JUNIOR, G. A. *Manual de Auditoria: Curso de Métodos Modernos de Controle de Alimentos. GMP/HACCP/AUDITORIA - OPAS*. Rio de Janeiro, maio de 2005.

- CRUZ, T. A. Aspectos econômicos da criação de rãs. In: LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. *A tecnologia da criação de rãs*. Viçosa: UFV, 1992.
- DI GIACOMO, R. F.; KOEPESELL, T. D. Sampling for detection of infection or disease in populations. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.189, p. 22-23, 1986.
- FEIX, R. D.; ABDALLAH, P. R.; FIGUEIREDO, M. R. C. Resultado econômico da criação de rã em regiões de clima temperado, Brasil. *Informações Econômicas*, SP, v.36, n.3, mar. 2006.
- FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C.; PAIVA NETO, J. S. Introdução à ranicultura. *Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 33, 15 p., 2002.
- FONTANELLO, D.; FERREIRA, C. M. *Histórico da Ranicultura Nacional*. Instituto de Pesca. Disponível em: <<http://www.aquicultura.br/historico.htm>>. Acesso em: 09 de junho de 2006.
- FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.
- FRANCO, R. M. *Escherichia coli: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em linguiça frescal tipo Toscana*. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Tecnologia de P.O.A.) – Universidade Federal Fluminense, 2002, 153 p.
- FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2003.
- GARCIA, C. A.; SILVA, N. R.; APPOLINÁRIO, A. V. M. pH de carne de rãs Touro Gigante (*Rana catesbeiana*, Shaw). *Higiene Alimentar*, v. 13, n. 66/67, p. 77-80, nov./dez., 1999.
- GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 2.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 655p.
- GIOVANELLI, J.G.R.; HADDAD, C.F.B.; ALEXANDRINO, J. Predicting the potential distribution of the alien invasive American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) in Brazil. *Biol Invasions*, 8 ago. 2007, v. 10, p.585-590, 2007.
- 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.
- GRAY, M. J.; RAJEEV, S.; MILLER, D. R.; SCHUMUTZER, A. C.; BURTON, E. C.; ROGERS, E. D.; HICKLING, G. J. Preliminary evidence that American Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) are suitable hosts for *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4066 -4068, jun. 2007.

GUIONE, S.; MARTINO; ALDABE, J.; BARTESAGHI, L.; BLANCO, D.; BRAZEIRO, A.; CALVAR, M.; GARCIA, G.; TAGLIANI, L. G.; GONZÁLEZ, E.M.; RIVAS, M.; SCARLATO, G.; SOUTULLO, A. Rana Toro (*Lithobates catesbeianus*) En Uruguay – Biodiversidad – Geo Uruguay: Informe del estado del ambiente GEO-Uruguay. Cap. 4, p.28. Disponível em: <<http://www.ambiental.net/noticias/reportes/GeoUruguayCap04.pdf>>. Acesso em: 04 de dezembro de 2008.

HOLT, J. G. ; KRIEG, N. R. ; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Facultatively anaerobic Gram negative. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9 th. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 787 p. Group 5, p. 175-197.

IFSC - Instituto de Física de São Carlos. Atlas de dissecação dos vertebrados. Aula online de Biologia II. Laboratório de Biologia - IFSC. Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://biologia.ifsc.usp.br/bio2/atlas/Ra.pdf>>. Acesso em: 03 de março de 2007.

IHDCA - Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental (The Nature Conservancy), 02 mar. 2007. Disponível em: <http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/lithobates_catesbeianus.htm>. Acesso em: 29 de setembro de 2008.

JAKABI, M. J.; BUZZO, A. 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.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KAKU, M.; PERESI, J. T. M.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; BATISTA, A. B.; CASTANHEIRA, I. A. Z.; GARCIA, G. M. P.; IRINO, K.; GELLI, D. S. 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 for the Microbiological Examination of Foods*, 4 ed. APHA, Washington, D.C., 2001. 676 p. cap. 8, p. 69-80.

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

LIMA, S. L.; AGOSTINHO, C. A. *A Tecnologia de criação de Rãs*. Viçosa: Ed. Folha de Viçosa Ltda. 1992. 168 p.

LIMA, S. L.; CRUZ, T. A.; MOURA, O. M. *Ranicultura: Análise da Cadeia Produtiva*. Viçosa: Ed. Folha de Viçosa Ltda. 1999. 172 p.

LIMA, S. L.; MOURA, O. M.; RAMOS, E. M. *Ranicultura*. Universidade Federal de

Viçosa. Em 29 de outubro de 2000. Disponível em:
<<http://www.ufv.br/dta/ran/index.htm>>. Acesso em: 23 de junho de 2006.

LOAIZA, J. F. U. *Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de carne de rã (Rana catesbeiana) estocada sob refrigeração e congelamento*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 1996, 112 p.

MADEIRA, M.; FERRÃO, M. E. M. *Alimentos conforme a lei*. São Paulo: Manole, 2002. 443 p.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. N., PARKER, J. *Microbiologia de Brock*, 10 ed. São Paulo: Pearson-Prentice Hall, 2004.

MARANHÃO, H. P. *Ranicultura - Histórico*. Sociedade Nacional de Agricultura. Disponível em:<http://www.snagricultura.org.br/cria_ra_hist.htm>. Acesso em: 23 de junho de 2006.

MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; WILLEBERG, P. *Veterinary Epidemiology Principles and Methods*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1987. 343p.

MATHIAS, M. A. C. *Potencial produtivo de criação de rãs no Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro: SEBRAE/RJ. 2004. 100 p.

MELLO, S. C. R. P. *Comercialização. IX ENAR & Techonofrog'97*, Santos, SP, jul. 1997.

MELLO, S. C. R. P. *Criação de Rãs na América Latina. Boletim do Capítulo Latinoamericano e Caribenho da Sociedade Mundial de Aqüicultura*. Boletim 02 agosto de 2005. Disponível em:
<https://www.was.org/LAC-WAS/boletins/boletim04/03_reportagem/02port_3.htm>. Acesso em: 16 de janeiro de 2007.

MELLO, S. C. R. P.; PESSANHA, L. S.; MANO, S.; FRANCO, R. M.; PARDI, H. S.; SANTOS, I. F. *Avaliação Bacteriológica e Físico-Química da Polpa de Dorso de Rã Obtida por Separação Mecânica. Brazilian Journal of Food Technology*, v.9, n.1, p. 39-48, jan./mar. 2006.

MERCK *Microbiology Manual*. Berlin. Germany, 2000. 407p.

MOURA, O. M. A. *Efeitos de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e perfil das indústrias de abate*, 2000, 208 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa. 2000.

_____. *A carne de rã como matéria prima e seu uso e produtos derivados. Boletim Técnico do Instituto de Pesca*, São Paulo, v. 34, p. 68-73, nov. 2003a.

_____. A rã e o uso potencial de seus derivados na indústria de alimentos. *Panorama da Aquicultura*, v. 13, n. 80, p. 27-31, nov./dez. 2003b.

NOLL, I. B.; LINDAU, C. P. Aspectos da composição em nutrientes da carne de rã touro-gigante (*Rana catesbeiana*). *Caderno de Farmácia*, v. 3, n. 1/2, p. 29-36, 1987.

ORDÓÑEZ, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. *Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos*. Porto Alegre: Artmed, 2005a. 294 p. v.1.

_____; _____. *Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005b. 279 p. v.2.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. *Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne*. v I. Goiânia: UFG, 2001. 623 p.

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

RAMOS, E. M. *Efeito de diferentes métodos de abate sobre o desenvolvimento do Rigor Mortis e qualidade da carne de rã-touro (Rana catesbeiana, Shaw 1802)*. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2004, 182 p.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M; FONTES, P. R.; RAMOS, A. L. S.; PETERNELLI, L. A. Meat color evaluation and pigment levels in bullfrog (*Rana catesbeiana*) slaughtered by different methods. *Aquaculture*, v. 245, n. 2005, p. 175–182, 2005.

ROÇA, R. O. *Microbiologia da carne*. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP). Botucatu: FCA-UNESP, 2000 (artigo técnico). Disponível em: <<http://puhrs.campus2.br/~thompson/TPOA-Carne/Roca106.pdf>>. Acesso em: 05 de outubro de 2006.

RODRIGUES, R. L.; LEITE, M. O.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação bacteriológica de carne de rã (*Leptodactylus* sp.) congelada, comercializada em Niterói, RJ. *Higiene Alimentar*, v. 8, n. 31, p. 19-24, jun., 1994.

RODRIGUES, D. P. *Ecologia e prevalência de Salmonella spp. em aves e material avícola no Brasil*. In: CONFERÊNCIA APINCO 2005 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. *Anais...*Santos: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia avícolas, 2005, v.2, p. 223-237.

ROY, E. M. *Other aquatic life of economic significance: frog and frog legs*. In: *Marine e Freshwater Products Handbook*. CRC Press, p. 279-287. 2000.

SANT'ANA, R. Propostas de normas higiênico-sanitárias de abatedouro de rãs para pequenos e médios produtores. *IX ENAR & Techonofrog'97*, Santos, SP, jul. 1997.

SHRIVASTAVA, K.P. The occurrence of salmonellas in raw frozen frog legs. *Journal of Applied Bacteriology*, v.45, n.3, p.407-410, 1978.

SILVA, N. R. da; OLIVEIRA, L. A. T. Ocorrência de Salmonela na carne de rã (*Rana catesbeiana*, Shaw – 1803). *Higiene Alimentar*, v. 8, n. 31, p. 36-40, jun., 1994.

_____; _____. Ocorrência de Salmonela na carne de rã (*Rana catesbeiana*, Shaw – 1803). *IX ENAR & Techonofrog'97*, Santos, SP, jul. 1997.

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

SOUZA, S. S. de. Alimentos Seguros: Orientações técnicas. Gerência de Comunicação e Educação da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo e Coordenação de Vigilância em Saúde, São Paulo, 2004. 40 p.

TAMBUNAN, P. R.; HERUWATI, E. S. Problems of Salmonella in frog legs. Research Institute of Fishery Technology Jakarta, Indonesia, 1978. Disponível em: <<http://www.apfic.org/Archive/symposia/1978/18.pdf>>. Acesso em: 05 de dezembro de 2008.

TAUNAY, A. E.; FERNADES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. The role of Public Laboratory in the problem of Salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Revista do Insituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.38, n.2, p.119-127, 1996.

TEIXEIRA, R. D.; MELLO, S. C. R. P.; SANTOS, C. A. M. L. dos. The world market for frog legs. *GLOBEFISH, FAO's Fishery Industries Division*, Rome, Italy, v. 68, jun. 2001.

TEIXEIRA, D. Mercado internacional de ancas de ranas. Argentina: GLOBEFISH, FAO, 2002. Disponível em: <www.sagpya.mecon.gov.ar>. Acesso em: 05 de dezembro de 2008.

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.

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

VIZOTTO, L.D. Ranicultura. *Ciência e Cultura*, v.36, n.1, p.42-45, 1984.

YDE, M.; MAEYER-CLEEMPOEL, S. de. The microbiological quality of retail frozen legs in Belgium. *Belgium Journal of Food Chemistry and Biotechnology*, v.40, n.1, p.3-8, 1985.

WEICHERT, M. A. *Estudo de mercado sobre varejo e consumo de carne de Tilápia e Rã nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói - RJ*. Rio de Janeiro: SEBRAE, 17 ago. 2007. CD-ROM.