

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Salmonella* spp. E *Clostridium perfringens* EM FARINHAS
DE ORIGEM ANIMAL UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DE
RAÇÕES E AVALIAÇÃO DE ADITIVO NA INIBIÇÃO DE
PATÓGENO**

Marita Vedovelli Cardozo

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Salmonella* spp. E *Clostridium perfringens* EM FARINHAS
DE ORIGEM ANIMAL UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DE
RAÇÕES E AVALIAÇÃO DE ADITIVO NA INIBIÇÃO DE
PATÓGENO**

Marita Vedovelli Cardozo

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2011

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

***Salmonella* spp. E *Clostridium perfringens* EM FARINHAS DE
ORIGEM ANIMAL UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DE
RAÇÕES E AVALIAÇÃO DE ADITIVO NA INIBIÇÃO DE
PATÓGENO**

Marita Vedovelli Cardozo

Orientador: Prof. Dr. Ruben Pablo Schocken-Iturrino

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2011

C268s Cardozo, Marita Vedovelli
 Salmonella spp. e *Clostridium perfringens* em farinhas de origem
 animal utilizadas na fabricação de rações e avaliação de aditivo na
 inibição de patógeno / Marita Vedovelli Cardozo. – – Jaboticabal,
 2011
 vi, 46 f. : il. ; 28 cm

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
 Orientador: Ruben Pablo Schocken Iturrino
 Banca examinadora: Oswaldo Durival Rossi Junior, Alessandra
 Aparecida Medeiros
 Bibliografia

 1. Avicultura. 2. Microbiologia. 3. Sanidade animal. I. Título. II.
 Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

 CDU 616.981.49:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MARITA VEDOVELLI CARDOZO - Nascida em Jaboticabal, SP, em 22 de junho de 1984, filha de Vanda Vedovelli Cardozo e Oswaldo Pereira Cardozo. Bióloga, graduada em Licenciatura em janeiro 2007 e em Bacharelado em janeiro de 2008, pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal. Foi bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de agosto de 2004 a julho de 2007. Foi bolsista de Apoio Técnico do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de junho de 2008 a fevereiro de 2009. Em março de 2009 iniciou o Mestrado pelo Programa de Microbiologia Agropecuária, com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) até fevereiro de 2011.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas
admiráveis.”*

(José de Alencar)

Agradecimentos

A Deus, por me guiar em todos os caminhos e por me dar a estrutura necessária para vencer todos os obstáculos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rubén Pablo Schocken-Iturrino, pelos valiosos ensinamentos e grande amizade nesses anos de convívio.

Aos meus pais, Oswaldo Pereira Cardozo e Vanda Vedovelli Cardozo, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas. Obrigada pela confiança em mim depositada, pelo carinho, pela educação e amor incondicional sempre.

À minha irmã Lígia Vedovelli Cardozo (agora recém Araújo), pela torcida, pelo companheirismo, pela amizade e principalmente pela preocupação em relação a mim que, igual a ela, dificilmente outra pessoa possui.

Às minhas tias, tios, primas, primos, namorado, cunhado e avós, que são muito importantes e muito presentes em minha vida. Só tenho a agradecer por ter uma família tão unida. A todos vocês (aqui cito novamente irmã e pais) obrigada por me ajudarem nas horas mais difíceis e por estarem comigo em todos os momentos, alegres ou tristes.

Às meninas do laboratório: Mariana Beraldo Massoli, Mariana Froner Casagrande, Livia Boarini, Livia Gerbasi Beraldo e Clarissa Araújo pela grandiosa e indispensável ajuda na execução do experimento, ajuda com a estatística, ajuda em momentos de tensão com o computador e também pelas risadas, conversas, jantinhas para aliviar o stress, e acima de tudo, pela amizade.

Ao amigo Ricardo Cavani, pelo auxílio em relação às amostras, ao processamento das farinhas, às sorotipagens e por estar sempre tão disposto a ajudar.

À Silvina, Edna, Rosângela e todos os funcionários do Departamento de Microbiologia Agropecuária pelos favores no laboratório e atenção nos momentos mais inusitados.

Ao Prof. Antonio Monteiro, Prof. Hélio Montassier, Prof. Ely Nahas, Prof. Fernando de Ávila e todos os alunos do Departamento de Microbiologia Agropecuária, que de maneira direta ou indireta, auxiliaram na realização desse trabalho.

Ao Prof. Oswaldo Durival Rossi Junior (Duri) e às amigas Ana Maria Centola Vidal Martins, Natacha Cereser, Thaís Martinelli, Rachel Saba, Natalia Nespolo, Fernanda Rezende, Ana Lígia Cortez e Poliana Melo, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, pessoas que já me ensinaram muito e que, mesmo distantes, continuam me dando bons conselhos sempre que preciso! Raks, muito obrigada pela ajuda com a Novobiocina!

Às professoras Fabiana Pilarski e Alessandra Medeiros, por terem aceitado o convite de participação da banca da minha qualificação e defesa, respectivamente, e, principalmente pelas ótimas sugestões.

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa, pelo auxílio com as análises estatísticas.

Aos amigos Juliano, Marcinha e Renato pelo auxílio das mais diversas formas e pela presença em tantos momentos.

A todos os meus amigos “da cidade” e “da faculdade” pelos momentos de alegria e descontração, pela compreensão quando me ausento das festinhas para trabalhar no laboratório ou estudar, pelo apoio e pela amizade de tantos anos!

Ao Flávio Longo, Ivone Silva e Márcio Lanzarin, pesquisadores da empresa Btech, pela incontestável colaboração e atenção para realização de uma das etapas do experimento.

À Angela, pelas entregas de materiais sempre no momento oportuno e pelas conversas na hora de distração.

Aos funcionários da Pós Graduação pelas respostas à tantas dúvidas em relação aos prazos e ofícios, e também aos funcionários da Biblioteca pela ajuda principalmente com as referências.

Aos abatedouros de aves e graxarias que permitiram as visitas e as coletas das amostras, sem esta colaboração seria impossível a realização da pesquisa.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de Mestrado concedida.

SUMÁRIO

Assunto	Página
Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras.....	iv
 RESUMO.....	 v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL (FOAs)....	03
2.1.1 Legislação das FOAs.....	04
2.1.2 Processamento das FOAs.....	05
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>Salmonella</i>	08
2.2.1 Patogenicidade.....	10
2.3 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO <i>Clostridium</i>	11
2.3.1 Patogenicidade.....	11
2.3.2 Enterite Necrótica Aviária (ENA).....	12
2.4 CONTROLE QUÍMICO MICROBIANO EM FOAs.....	13
2.4.1 Ácidos orgânicos e Formaldeídos.....	15
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Caracterização da graxaria.....	18

4.2 Isolamento dos microrganismos.....	18
4.2.1 Amostragem.....	18
4.2.2 Diluição Inicial.....	19
4.2.3 <i>Salmonella</i> spp.....	19
4.2.3.1 Enriquecimento seletivo.....	19
4.2.3.2 Plaqueamento seletivo.....	19
4.2.3.3 Provas bioquímicas e sorotipagem.....	20
4.2.4 <i>Clostridium perfringens</i>	20
4.2.4.1 Choque térmico.....	20
4.2.4.2 Plaqueamento Seletivo.....	21
4.2.4.3 Provas bioquímicas.....	21
4.3 Teste de eficiência do produto químico.....	21
4.3.1 Amostragem.....	22
4.3.2 Preparo do inóculo.....	22
4.3.3 Preparo das amostras para teste.....	22
4.4 Análise Estatística.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

Lista de Tabelas

Assunto	Página
1- Números de amostras positivas para presença de <i>Clostridium perfringens</i> e <i>Salmonella</i> spp. de farinhas de carne e ossos (FCO), farinhas de sangue e penas (FSP) e farinhas de vísceras (FV).....	25
2- População <i>Clostridium perfringens</i> em amostras de farinhas de origem animal tratadas com formaldeído e ácidos orgânicos e amostras controle após 24 horas de incubação.....	30
3- População de <i>Clostridium perfringens</i> em amostras de farinhas de origem animal tratadas com formaldeído e ácidos orgânicos e amostras controle após 5 dias de incubação.....	32

Lista de Figuras

Assunto	Página
1- Fluxograma de produção de Farinha de Vísceras e Farinha de Penas e Sangue.....	06
2- Fluxograma de produção de Farinha de Carne e Ossos.....	07
3- Resultados de amostras positivas para presença de <i>Salmonella</i> spp. e <i>C. perfringens</i> nos três tipos de farinhas analisados.....	27
4- Porcentagem de sorovares identificados através da tipificação.....	28

***Salmonella* spp. E *Clostridium perfringens* EM FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL
UTILIZADAS NA FABRICAÇÃO DE RAÇÕES E AVALIAÇÃO DE ADITIVO NA
INIBIÇÃO DE PATÓGENO**

RESUMO - O processamento dos resíduos gerados durante a produção avícola origina subprodutos que podem ser utilizados na alimentação animal resultando em rações economicamente viáveis. Entretanto, a qualidade dos ingredientes que compõem a ração é de extrema importância, pois o alimento pode veicular diversos patógenos. Dessa forma foi desenvolvido o presente estudo, com o objetivo de avaliar através dos métodos bacteriológicos convencionais a qualidade microbiológica de Farinha de Visceras (FV), Farinha de Sangue e Penas (FSP) e Farinhas de Carne e Ossos (FCO) no que se refere a contaminação pelos microrganismos *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens*, bem como testar a eficiência para inibição microbiana de um produto químico a base de formaldeído e ácidos orgânicos. Das 180 amostras de farinhas analisadas, 71 (39,4%) apresentaram resultado positivo em relação à presença de *C. perfringens*, e 41 (22,8%) apresentaram resultado positivo quanto à presença de *Salmonella* spp. O produto a base de formaldeído e ácidos orgânicos mostrou-se eficiente na inibição de *C. perfringens* pois as contagens diminuíram significativamente após 24 horas e, após cinco dias foi observado ausência total do microrganismo nas amostras testadas. A presença dos patógenos *Salmonella* spp. e *C. perfringens* em todos os tipos de farinhas analisadas evidencia que este sub-setor necessita de aportes tecnológicos, além de serem responsáveis por perdas econômicas aos produtores e um risco à saúde pública. A eficiência do produto químico testado mostra que existe forma de inibir o crescimento do *C. perfringens*, um grande avanço para a avicultura.

Palavras-chave: alimento, avicultura, desempenho produtivo, microbiologia, sanidade animal

***Salmonella* spp. E *Clostridium perfringens* IN ANIMAL MEAL USED IN THE MANUFACTURE OF FEED AND EVALUATION OF THE ADDITIVE INHIBITION OF PATHOGEN**

SUMMARY - The processing of the waste generated during production originates poultry products that can be used in animal feed rations resulting in economically viable. However, the quality of the ingredients in the diet is extremely important, because the food may carry various pathogens. Thus the present study was developed with the aim to assess by conventional bacteriological methods the microbiological quality of poultry offal meal (POM), Blood Meal and Feather (FSP) and Meat and Bone meal (MBM) with regard to contamination by pathogens *Salmonella* spp. and *C. perfringens*, as well as testing the efficiency of the chemical basis of formaldehyde and organic acids. Of 180 flour samples analyzed, 71 (39.4%) were positive for the presence of *Clostridium perfringens*, and 41 (22.8%) were positive for the presence of *Salmonella* spp. The base product of formaldehyde and organic acids proved effective in inhibiting *C. perfringens* as the counts decreased significantly after 24 hours, and after five days was observed total absence of the microorganism in the samples tested. The presence of the pathogens *Salmonella* spp. e *C. perfringens* in all kinds of flours analyzed shows that this sub-sector needs technological contributions, besides being responsible for economic losses to producers and a public health risk. The efficiency of the chemical test shows that there is no way to inhibit the growth of *C. perfringens*, a major breakthrough for the poultry industry.

Key words: food, aviculture, production performance, microbiology, animal health

1. INTRODUÇÃO

A necessidade da utilização da proteína animal na dieta humana e o crescente aumento da população mundial (COSTA, 2008) fez com que a produção avícola se tornasse uma das atividades agroindustriais mais desenvolvidas do mundo e uma das mais importantes do Brasil (FIGUEIREDO, 2001).

Durante todo o processamento do frango de corte no abatedouro, ocorre uma perda de produto em torno de 35%, gerando uma quantidade significativa de resíduos, como as penas, sangue e ossos. Além da questão ambiental, o aproveitamento dos resíduos das aves abatidas é um fator econômico importante, pois é preciso investir em maior produtividade a baixo custo. Uma das formas de aproveitamento desses resíduos é seu processamento, que origina subprodutos que podem ser utilizados na alimentação animal resultando em rações economicamente viáveis e eficientes (NUNES et al., 2005).

Entretanto, não restam dúvidas que o desempenho da produção animal depende da qualidade da ração fornecida, pois problemas que acometem os animais têm grandes chances de estarem ligados a uma ração de má qualidade (BELLAYER, 2010). Por este motivo, é fundamental que exista um monitoramento na produção das matérias primas para identificação e solução dos problemas que possam vir a comprometer a qualidade microbiológica do produto final (BELLAYER, 2002).

Mesmo com avanços tecnológicos, os subprodutos de origem animal ainda são frequentemente sujeitos a contaminações bacterianas, especialmente por microrganismos dos gêneros *Salmonella* e *Clostridium*.

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp. é um patógeno Gram negativo de importância em sanidade humana e animal pois é isolado e identificado com frequência como agente etiológico de surtos de toxinfecções veiculadas por alimentos (SIQUEIRA et al., 2003). Por este motivo, tem-se estimulado a busca de meios para reduzir ou eliminar *Salmonella* spp. antes do abate, uma vez que a redução das taxas de infecção pré abate resultam em aumento na segurança dos produtos e

subprodutos avícolas (FUNK et al., 2001). Assim como *Salmonella*, microrganismos do gênero *Clostridium* também podem afetar negativamente as aves.

Clostridium perfringens é um microrganismo em forma de bastonete, Gram positivo com esporos subterminais e centrais (SCHOCKEN-ITURRINO & ISHI, 2000), anaeróbio e produtor de vários tipos de toxinas capazes de provocar patologias diversas, entre elas, a enterite necrótica nas aves.

O controle da enterite necrótica aviária (ENA) é considerado um dos maiores desafios para a avicultura industrial. Além de um eficiente programa de biossegurança, a nutrição adequada dos animais é essencial para o êxito do controle da ENA (GIL de los SANTOS et al., 2008), uma vez que a alimentação das aves é a principal fonte de contaminação por *C. perfringens*, pois ingredientes da ração têm sido confirmados como veiculadores deste microrganismo e, portanto, foram relacionados à doença (DEKICH, 1998).

Com a restrição a utilização de antibióticos como promotores de crescimento, e a posterior aprovação do uso de produtos químicos em rações animais e suas matérias primas (ANITOX, 1998), diversas substâncias têm sido citadas para o controle de contaminantes, entre elas, ácido acético, ácido propiônico, ácido cítrico, etanol, formaldeído, ácido fórmico, álcool, acetato de zinco e propionato de zinco (RICKE et al., 2005).

Para controle de *Salmonella* spp., já existe uma ampla gama de produtos disponíveis, com diferentes modos de ação e comprovações científicas (WALES, 2010). Entretanto, pouco se relata sobre o combate de *C. perfringens* em produtos utilizados na fabricação de rações. Um dos motivos pode estar relacionado ao fato do microrganismo ser esporulado, o que lhe garante alta resistência à maioria dos tratamentos térmicos e químicos convencionais de controle do crescimento microbiano.

Baseado nessas informações idealizou-se o presente trabalho, visando o estudo microbiológico de farinhas de origem animal que serão utilizadas na fabricação de rações, no sentido de avaliar a presença de microrganismos que possam vir a comprometer a qualidade do produto, bem como testar a eficiência de um produto

químico a base de formaldeído e ácidos orgânicos na inibição do desenvolvimento do microrganismo *C. perfringens* em subprodutos de origem animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL (FOAs)

Entende-se por farinha de origem animal os resíduos de abatedouros não destinados ao consumo humano, resultantes de um processamento que atenda a um padrão de identidade e qualidade preestabelecido, nos aspectos higiênico sanitários, tecnológicos e nutricionais, podendo ser utilizadas na alimentação de animais não ruminantes (BRASIL, 2008).

A composição varia entre os diferentes tipos de farinha, e de acordo com Farmland (2001):

Farinha de sangue e penas (FSP) é o produto resultante da cocção sob pressão de penas limpas e não decompostas, obtidas no abate de aves, sendo permitida a participação de sangue desde que a sua inclusão não altere significativamente sua composição.

Farinha de vísceras (FV) é o produto resultante da cocção sob pressão, prensagem e moagem de vísceras de aves, sendo permitida a inclusão de cabeças e pés. Não devem conter penas e casca de ovo, os quais caracterizam adulteração.

Farinha de carne e ossos (FCO) é produto resultante da cocção de ossos e tecidos. Não deve conter sangue, pêlos e conteúdo estomacal.

As vantagens da utilização de farinhas de origem animal em rações abrangem desde aspectos econômicos, através da redução dos custos com rações, e por consequência de produção animal; até a geração de empregos e melhorias ambientais, com o tratamento dos resíduos do abate (BELLAYER, 2010)

A premissa máxima na fabricação de rações de alta qualidade certamente é a qualidade de seus ingredientes, sendo necessário monitorar sua composição e

processamento eficazmente. Quando se trata de subprodutos de origem animal, um maior cuidado é necessário, pois apresentam uma dificuldade de padronização em função de seu processo produtivo e da origem dos resíduos que os compõem. (BELLAYER, 2002).

O surgimento de infecções por *Salmonella* Agona e *S. Enteritidis* e, causando maior impacto, a Encefalopatia Espongiforme Bovina, abalaram a sensação de segurança dos países industrializados em relação a utilização de subprodutos de origem animal em alimentos (ANDERSEN et al., 2005). Entretanto, aplicando-se as leis cabíveis para garantia da redução de riscos na transmissão de doenças, a qualidade das farinhas animais pode ser assegurada (BELLAYER, 2010).

2.1.1 Legislação das FOAs

A legislação Brasileira do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003) que aprovava o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos que processam resíduos de animais destinados à alimentação animal, estabelecia que o produto colhido após o tratamento térmico não deveria conter bactérias patogênicas e esporos termorresistentes, especificando “ausência de *Clostridium perfringens*”. Além disso, amostras de cada lote do produto final, antes de ser armazenado, deveriam ser submetidas à pesquisa e apresentarem ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra.

Porém, o Ministério da Agricultura através da Instrução Normativa nº34, de 28 de maio de 2008 (BRASIL, 2008), que regulamenta a Inspeção Higiênico Sanitária e Tecnológica do Processamento de Resíduos de Origem Animal, revogou a legislação anterior, estabelecendo agora que devem estar previstas análises periódicas para garantir a ausência de *Salmonella* spp. em 25g do produto acabado. Além disso, as análises devem ser realizadas em laboratório do próprio estabelecimento ou em laboratório terceirizado, desde que tenham um sistema de garantia da qualidade e metodologias reconhecidas internacionalmente. Entretanto, a legislação vigente não cita o *Clostridium perfringens*, não especifica a necessidade da ausência deste

microrganismo no produto acabado ou sequer estabelece um padrão de contagem máxima permitida.

A necessidade da ausência total da *Salmonella* spp. em subprodutos de origem animal se justifica principalmente pelo fato de que, mesmo quando presentes em baixos números, este microrganismo é capaz de se multiplicar em ambientes quentes e úmidos, como é o caso dos silos e comedouros (WALES, 2010).

Calixto et al. (2002) em estudo com 120 amostras de farinhas de origem animal, identificaram 25 amostras fora dos padrões estabelecidos pela legislação, por apresentarem-se positivas para *Salmonella* spp.

Foi realizado um monitoramento pela indústria de rações na União Européia e verificou-se que as farinhas de origem animal estavam contaminadas por *Salmonella* (ANON, 2007), não atendendo ao especificado pela Normativa 34 (BRASIL, 2008).

Prió et al (2001) analisaram a contaminação por *Salmonella* e *Clostridium* em farinhas e na ração final. Os resultados apontaram a presença de ambos os microrganismos tanto nas farinhas quanto nas rações. Embora nada seja especificado na legislação vigente em relação ao *C. perfringens*, sua presença nos alimentos para consumo animal é indício de alguma falha durante o processamento (SCHOCKEN-ITURRINO & ISHI, 2000).

2.1.2 Processamento das FOAs

O processamento de farinhas pode ser feito através de dois sistemas básicos, um deles são os frigoríficos com produção própria e o outro, sistemas de coleta de resíduos por processadores independentes. Em quaisquer dos casos, a norma oficial estabelece que as matérias primas devam ser processadas dentro de 24 horas após o abate dos animais (SILVA, 2009).

O fluxo do processo de produção deve ser unidirecional. Consiste basicamente na retirada dos excessos de água dos resíduos não comestíveis e, se necessário, devido ao tamanho das peças, picar, triturar e levá-los aos digestores para cocção.

A cocção é obrigatória para todos os tipos de farinhas pois é proibido que os resíduos sejam destinados a alimentação animal sem passarem pelo tratamento térmico, com a função de eliminar microrganismos patogênicos. O aquecimento para farinhas segue o estabelecido pela IN 34, na qual a temperatura não pode ser inferior a 133°C, durante pelo menos 20 minutos, sem interrupção, a uma pressão absoluta não inferior a 3 bar, produzida por vapor saturado (BRASIL, 2008).

Em seguida, a gordura é drenada, prensada ou centrifugada e o resíduo sólido moído na forma de farinha com especificações de granulometria variáveis. De acordo com Bellaver (2002), a granulometria é baseada através da porcentagem de retenção em peneiras apresentando diferentes medidas de malhas. A granulometria mais utilizada é de 5% de retenção em peneira com malha de 2mm.

Através do fluxograma do processamento das farinhas de origem animal (Figuras 1 e 2), observa-se que existem várias etapas em que o risco de contaminação ou proliferação microbiana é eminente, podendo interferir na qualidade do produto final.

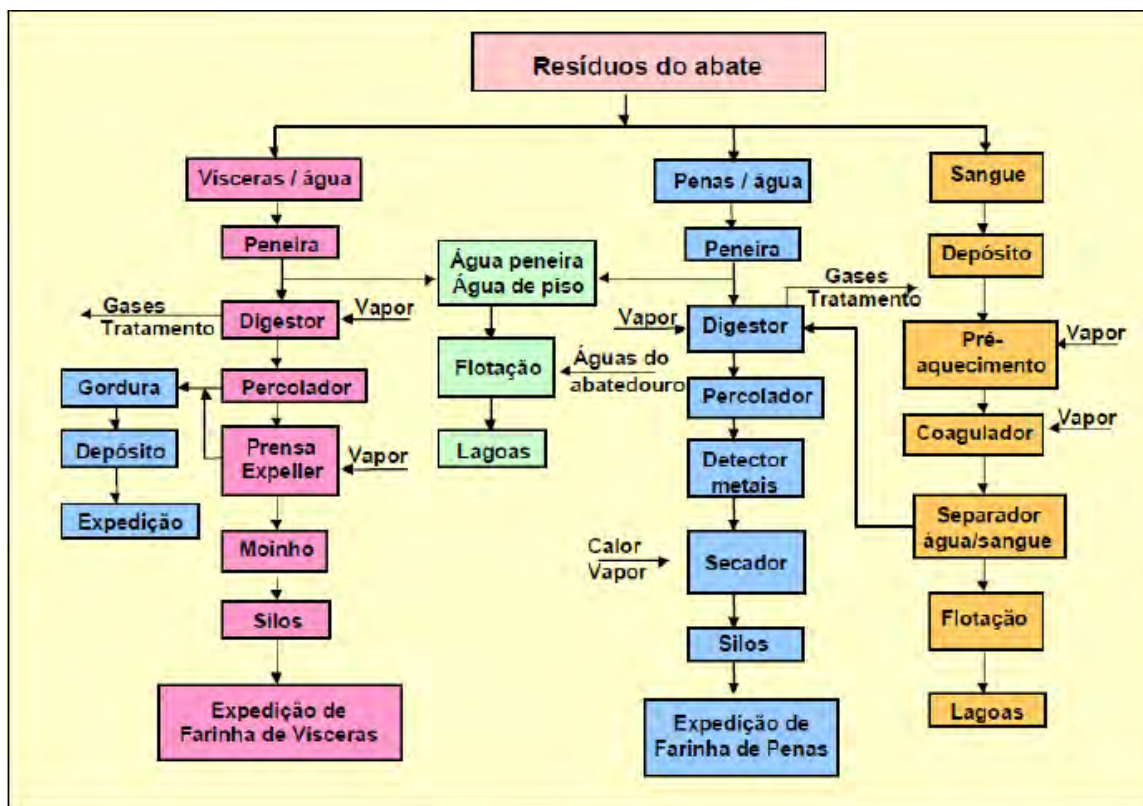


Figura 1 Fluxograma de produção de Farinha de Visceras e Farinha de Sangue e Penas (BELLAYER, 2002)



Figura 2 Fluxograma de produção de Farinha de Carne e Ossos (BELLAYER, 2002)

A ubiquidade de microrganismos no ambiente, associada às práticas da indústria alimentícia, em que a produção em massa leva a um aumento da contaminação cruzada, são fatores que contribuem para a disseminação de patógenos nos produtos e subprodutos de origem animal na cadeia global de alimentos (LINDER, 2002).

Outra fonte de contaminação dos produtos de origem animal são os próprios operadores de fábrica. Por este motivo, destaca-se a necessidade de capacitação e conscientização dos funcionários para o sucesso do controle microbiológico (LONGO et al, 2010)

Segundo Longo et al. (2010), a principal estratégia para o sucesso do controle microbiológico em farinhas de origem animal é o monitoramento de todo o processo produtivo, evitando possíveis falhas. Para isto, é interessante associar as ferramentas

de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP), Boas Práticas de Fabricação (BPF), tratamentos térmicos e químicos aplicados em uma ou mais etapas da fabricação e cuidados no armazenamento (WALES, 2010).

De acordo com Rossi Junior et al. (2006), uma das formas de reduzir a proliferação de microrganismos durante o processamento de produtos alimentícios e suas matérias primas é obedecer o binômio tempo x temperatura nos tratamentos térmicos, e evitar a formação de biofilmes nos equipamentos, característica que favorece a recontaminação do produto (VESTBY, 2010).

Vidal-Martins et al. (2008) afirmam que microrganismos esporulados podem sobreviver a altas temperaturas e, uma vez que o tratamento térmico não seja 100% eficiente na destruição desses microrganismos, o aquecimento pode exercer efeito estimulante sobre a multiplicação.

García et al. (2001) analisaram culturas de *C. perfringens* que foram submetidas a temperaturas subletais altas e baixas. Os microrganismos que receberam os choques de temperaturas tornaram-se quase duas vezes mais resistente do que os microrganismos controle. Os autores concluíram que, se expostas a temperaturas subletais, *C. perfringens* adquirem tolerância à temperaturas extremas.

Sabendo-se que os microrganismos esporulados tornam-se resistentes se expostos a temperaturas subletais (GARCÍA et al., 2001) o ideal seria aumentar a temperatura para eliminar os esporos. Entretanto o sobreaquecimento influencia negativamente a palatabilidade (FARMLAND, 2001) e afeta a disponibilidade de aminoácidos indispensáveis das FOAs (BELLAYER, 2002).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *Salmonella*

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Salmonella* é composto por microrganismos Gram-negativos, não esporulados, aeróbios, com flagelos peritríquios, com exceção da *S. Pullorum* e *S. Galinarum* (ESTEVES, 2005). Bioquimicamente são classificados como oxidase negativa, catalase positiva, indol negativa, produtoras de

gás a partir da glicose, redutoras de nitrato a nitrito e determinantes de hidrólise da uréia (ANDERSON & ZIPRIN, 2002).

Salmonella spp. não tolera concentrações de sal superiores a 9% (FRANCO & LANDGRAF, 1996) e possui temperatura ótima de crescimento de 36 a 43°C. Embora o pH ótimo para a multiplicação seja em torno de 7, existe a possibilidade de sobrevivência a uma variação de 4 a 9,50 (D'AOUST, 1989).

A classificação taxonômica deste gênero sempre foi motivo de controvérsias. Existem vários esquemas propostos mas, atualmente, vem ganhando aceitação internacional a classificação utilizada pelo Center for Disease Control and Prevention baseado no sistema Kaufmann-White (TINDALL et al, 2005).

Nesse sistema, o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, a *S. bongori* e a *S. enterica*, sendo que esta última é subdividida em seis subespécies: Enterica, Salamae, Arizonae, Diarizonae, Houtenae e Indica, as quais foram classificadas com base em seus hospedeiros e na homologia de DNA (POPOFF et al., 2001).

Segundo Popoff et al. (2001), existem 2543 diferentes sorovares de *Salmonella*. Entretanto, apesar da grande diversidade de marcadores fenotípicos e genotípicos existentes, a sorotipagem continua a ser a técnica mais utilizada para reconhecimento dos isolados de *Salmonella* (ESTEVES, 2005).

A infecção por *Salmonella* pode se dar de diversas maneiras, dentre as principais vias encontram-se os alimentos e a água, ocasionando graves enfermidades (VAHL, 2008)

A dose infectante deste microrganismo no homem é de apenas 100 células, podendo ser ainda menor, dependendo da idade, do estado imunológico do hospedeiro (GAWANDE & BHAGWA, 2002) e também pela composição do alimento ingerido. Sabe-se que a presença de um elevado conteúdo em gordura e/ou açúcar no alimento, protege a bactéria das barreiras gástricas naturais permitindo que alcance o intestino sem sofrer qualquer dano (D'AOUST, 1994). Já a dose infectante para os animais sob estresse é menor, podendo ser inferior a 1 UFC / g (HINTON & LINTON, 1988).

Um dos maiores desafios enfrentados pela avicultura em relação à *Salmonella* é evitar a ocorrência de doenças transmissíveis aos seres humanos e garantir a saúde e o desempenho das aves (CORTEZ, 2006).

2.2.1 Patogenicidade

O gênero *Salmonella* abriga as espécies causadoras da febre tifóide, das febres entéricas, e das enterocolites, também conhecidas como salmoneloses (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A atividade toxigênica de *Salmonella* desencadeia hipertermia, coagulopatias, leucopenia, acidose láctica, hipotensão e profundos transtornos no metabolismo protéico, conduzindo a uma rápida degradação das condições físicas do hospedeiro (ESTEVES, 2005). Entre as patogenias mais frequentemente observadas em animais encontram-se enterites e septicemias (LONGO et al., 2010) e em humanos variam de simples gastroenterite até a morte.

Os animais infectados por diferentes sorovares de salmonela podem desenvolver patogenias clínicas ou assintomáticas, albergando esses agentes e tornando-se fonte de infecção em potencial da bactéria para outros animais e para o homem (BARROW, 1993).

Foram mais de 155 mil casos de salmonelose notificados na União Européia (EFSA, 2009) e cerca de 1,3 milhões de casos anuais a nível mundial, resultando em 16 mil hospitalizações e 600 mortos (THONG et al., 2002), sendo que a maioria dos casos pode não ter sido registrado, estimando-se que este número seja 20 a 100 vezes superior (ESTEVES, 2005).

Wales (2010) descreve que surtos de salmoneloses em seres humanos continuam sendo um grave problema de saúde pública, existindo uma forte predominância dos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (WALES, 2010).

As aves foram reconhecidas como uma importante fonte de infecção humana por salmonelas desde que se intensificou a comercialização de produtos avícolas (CORY et al., 2002). A contaminação por *Salmonella* na ração animal pode também ser

transferida na cadeia alimentar humana através de ovos (DAVIES et al, 2001; CORRY et al, 2002)

2.3 CARACTERIZAÇÃO DO GÊNERO *Clostridium*

Pertencentes à família *Bacillaceae*, microrganismos do gênero *Clostridium* são anaeróbios, encapsulados, móveis e, bioquimicamente, são classificados como gelatinase, maltose, sacarose, indol e nitrato positivos, e salicina negativos (GOMES et al., 2008)

A temperatura ótima para crescimento é de 37 a 45 °C e o pH próximo à neutralidade, cerca de 7 (BLASCHEK & SOLBERG, 1981). Entretanto, na forma esporulada, os clostrídios podem sobreviver às extremas variações de temperatura e acidez (CATO et al., 1986).

Existem aproximadamente 100 espécies de *Clostridium*, muitas são comumente encontradas na microbiota intestinal dos humanos e de animais saudáveis, dentre elas destaca-se o *Clostridium perfringens* (GOMES et al., 2008). Entretanto, se o microambiente digestivo for alterado, ocorre uma proliferação dessas bactérias e então, a ocorrência de enfermidades (LOBATO & ASSIS, 2005).

O *C. perfringens* é, provavelmente, uma das espécies potencialmente patogênicas deste gênero mais difundidas no mundo e, sem dúvida, a mais importante causadora de enterites por *Clostridium* em animais domésticos (BERCHIERI JUNIOR & MACARI, 2000).

2.3.1 Patogenicidade

Clostridium perfringens é classificado em 5 tipos, sendo eles A, B, C, D e E. Esta divisão é baseada nas toxinas protéicas produzidas (ESTEVES, 2005). Tratando-se de toxinas, esses microrganismos são capazes de produzir inúmeras substâncias tóxicas. São pelo menos 12 diferentes tipos de toxinas, sendo que quatro são apontadas como

as mais importantes no ponto de vista patogênico, denominadas alfa, beta, epsilon e iota (GOMES et al., 2008).

Uma das principais é a alfa toxina, uma enterotoxina termo-lábil, que altera estruturalmente as membranas celulares e afeta a função celular. Embora o seu modo de ação exato não seja claramente definido, esta é uma toxina letal que causa necrose hemorrágica e destruição significativa das vilosidades intestinais (ROOD, 1998)

Várias são as afecções causadas pelos diferentes tipos de toxinas do *Clostridium perfringens*. Tais patogenias podem afetar seres humanos e animais, dentre elas encontram-se as intoxicações alimentares, colite pseudomembranosa (ROOD, 1998), carbúnculo sintomático (GOMES et al., 2008), gangrena gasosa (AWAD, 2001) e enterite necrótica (ESTEVES, 2005)

2.3.2 Enterite necrótica aviária (ENA)

A ENA é uma enterotoxemia aguda, que se apresenta em forma clínica ou subclínica (VAN IMMERSEEL et al., 2004), causada por *C. perfringens* dos tipos A e C.

Em infecções subclínicas, nota-se redução na absorção dos nutrientes, conseqüentemente, menor ganho de peso, diminuição da taxa de crescimento e piora na conversão alimentar (SCHOCKEN-ITURRINO & ISHI, 2000).

Os sinais clínicos nas aves são severa apatia, diminuição de apetite, penas arrepiadas, fezes com coloração escura, com ou sem manchas de sangue e diarréias. Algumas aves se apresentam desidratadas e com escurecimento da musculatura peitoral. A evolução da doença é rápida, podendo muitas vezes apresentar-se de modo agudo, ocasionando mortalidade de 5 a 15% do lote sem apresentar sinais mais específicos. Quando não medicada, a mortalidade persiste no lote por cerca de 10 a 14 dias (BERCHIERI JUNIOR & MACARI, 2000).

Afeta principalmente animais jovens, entre duas e cinco semanas de idade, aparecendo subitamente, e está geralmente associada à imunossupressão, provocando morte rápida com elevada prevalência (SCHOCKEN-ITURRINO & ISHI, 2000).

Fatores ambientais, tais como qualidade da cama, densidade populacional, local de criação, e ingredientes da ração (DEKICH, 1998) têm grande importância na multiplicação do *C. perfringens* e, conseqüentemente, são considerados fatores de risco para a ENA. (BERCHIERI JUNIOR & MACARI, 2000).

Do ponto de vista econômico, a ENA é conhecida por seu impacto negativo na produção avícola (VAN DER SLUIS, 2000). Dados atuais mostram que o Brasil exportou mais de 360 mil toneladas de carne de frango em julho de 2010 (AGRONEGOCIO, 2010). Estima-se que o prejuízo dessa doença seja de mais de U\$ 0.05 por animal, sendo que as perdas variam desde problemas com o aumento da conversão alimentar, redução do peso vivo, bem como aumento na condenação de carcaças (LOVLAND & KALDHUSDAL, 2001).

Lovland & Kaldhusdal (2001) em estudo com comparação de frangos de corte sadios e com ENA, revelaram diferença considerável no desempenho da produção, afirmando que os pesos reduzidos no momento do abate foi o fator negativo mais evidente.

Segundo Keyburn et al. (2006), a perfeita função intestinal é essencial para se obter uma conversão alimentar bem sucedida, entretanto quando com ENA, os animais apresentam lesões necróticas no intestino impedindo sua funcionalidade habitual (KEYBURN et al., 2006).

Como o *Clostridium perfringens* é um habitante normal do ceco e do intestino grosso, as patologias ocorrem principalmente quando quantidades significativas do microrganismo são ingeridas através de alimentos contaminados (BIGNARDE et al., 2008). Em vários surtos de enterite necrótica, a ração é uma das principais fontes de infecção (BERCHIERI JUNIOR & MACARI, 2000).

2.4 CONTROLE QUÍMICO MICROBIANO EM FOAs

Após a proibição da utilização indiscriminada de antibióticos como promotores de crescimento, aumentaram os casos de ENA pelo mundo. Como tentativa de controle de microrganismos, a legislação permitiu a utilização de substâncias químicas nas rações

e em farinhas de origem animal (ANITOX, 1998; EFSA, 2006). A partir de então, várias substâncias têm sido testadas, entre elas, ácido acético, ácido propiônico, ácido cítrico, etanol, formaldeído, ácido fórmico, álcool, acetato de zinco e propionato de zinco (RICKE et al., 2005).

Os aditivos bactericidas devem ser estáveis até o momento do consumo. Entretanto esses compostos devem ser metabolizados ou não serem absorvidos, evitando resíduos em carne e ovos dos animais que receberam o tratamento (EFSA, 2008).

Possíveis pontos negativos do uso indiscriminado de produtos químicos estão relacionados à volatilidade, corrosão e redução da palatabilidade (WALES, 2010).

Entretanto, quando utilizados a uma concentração de 3 kg/t em rações, e 6 kg/t em matérias primas, não existem efeitos negativos em relação à palatabilidade. (ANITOX, 1998). Além disso, a busca constante de diversos grupos de pesquisa e empresas tem sido desenvolver produtos a base de combinações de agentes químicos para obter um efeito sinérgico eliminando problemas de palatabilidade (LONGO et al. 2010).

Os benefícios da combinação de elementos químicos são diversos. Além de menores doses de produto, o que acarreta em uma redução de gastos econômicos, minimiza os problemas de corrosão e fumigação no ar ambiente, diminuindo riscos de intoxicação do operador. (LONGO et al., 2010). Segundo a European Food Safety Authority (2008), produtos à base apenas de ácidos necessitam de equipamentos específicos anti-corrosivos e procedimentos especiais de segurança e, quando combinados com outros agentes químicos, podem ser aplicados diretamente nos equipamentos

Produtos a base de formaldeído apresentam volatilidade acentuada. Essa característica faz com que, após aplicação em rações ou subprodutos avícolas, o produto possa ser perdido por evaporação, limitando seu efeito a longo prazo (KHAN et al, 2003). Este é outro fator benéfico do uso combinado de agentes antimicrobianos, pois associando-o com ácidos ou terpenos, reduz sua volatilidade (CARRIQUE-MAS et al, 2007).

Além da associação entre diferentes compostos químicos para garantir a eficácia nos efeitos esperados (WALES, 2010), alguns ensaios laboratoriais de empresas foram realizados e indicaram que a forma líquida pode ser mais eficiente que a forma em pó, utilizando-se a mesma formulação dos elementos, sugerindo que a dispersão e a penetração dos compostos são fatores importantes a serem considerados (LONGO et al., 2010)

2.4.1 Ácidos orgânicos e Formaldeído

A utilização de ácidos orgânicos para controlar a contaminação por enterobactérias em rações já foi observada, entretanto a eficiência depende da dose aplicada e do tempo de exposição ao produto (LONGO et al., 2010)

Os ácidos orgânicos são relativamente estáveis nos alimentos, e alguns deles ocorrem naturalmente em organismos vivos, especialmente no trato digestivo. São frequentemente selecionados para uso na alimentação animal porque são metabolizados pelos animais beneficiários e não deixam resíduos nos alimentos comercializados (WALES, 2010)

Segundo Wales (2010), os ácidos orgânicos são ácidos considerados fracos e classificados como conservantes, ou seja, substâncias que protegem os alimentos contra a deterioração causada por microrganismos ou seus metabólitos. Entretanto, o formaldeído mostrou-se mais eficiente para descontaminação de rações quando comparados com produtos a base de ácidos (MOUSTAFA et al., 2002).

Trabalhos têm demonstrado que o formaldeído apresenta um alto nível de atividade desinfetante contra um grande espectro de microrganismos e é considerado o composto mais eficiente para ser utilizado em estratégias de desinfecção de granjas contaminadas por Salmonella (DAVIES & WRAY, 1995).

Embora o formaldeído seja uma substância considerada perigosa, não existem evidências conclusivas de toxicidade em seres humanos (ARTS et al., 2006). Além disso, não causam efeitos adversos nos animais alimentados com rações ou seus ingredientes que foram tratados pelo produto (ALLEN, 1993; EFSA, 2006).

Barnhart et al (1999) mencionaram um modelo in vitro de utilização de formaldeído em ração para consumo animal e os resultados obtidos apontam uma redução significativa de *Salmonella*.

Existe uma ampla gama de produtos disponíveis, com diferentes modos de ação e comprovações científicas para controle de *Salmonella* (WALES, 2010). Entretanto, pouco se relata sobre o combate de *C. perfringens* em produtos utilizados na fabricação de rações. Um dos motivos pode estar relacionado ao fato do microrganismo ser esporulado, o que lhe garante alta resistência a muitos tratamentos térmicos e químicos convencionais de controle do desenvolvimento microbiano.

3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Tendo em vista as considerações apresentadas e que:

- O crescente aumento no consumo humano de produtos avícolas exige uma boa qualidade microbiológica na alimentação desses animais;
- Os microrganismos potencialmente patogênicos, como *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens*, têm sido isolados de subprodutos de origem animal, perpetuando problemas sanitários e ocasionando danos econômicos na produção avícola;
- O tratamento térmico, exigido no processamento, muitas vezes não atinge a temperatura adequada, sendo ineficiente na eliminação de microrganismos esporulados;
- Não existe no Brasil uma legislação de controle de qualidade para farinhas de origem animal que considere a contaminação por *Clostridium perfringens*;
- Apesar de muitos trabalhos encontrarem a presença de patógenos em farinhas de origem animal, poucos mostram soluções para o problema;
- Alguns trabalhos testam eficiência de produtos químicos para combate de *Salmonella*, entretanto não testam o efeito sobre inibição de *Clostridium perfringens*.

Idealizou-se o presente estudo tendo os seguintes objetivos:

- avaliar a qualidade microbiológica de farinha de vísceras, farinha de penas e sangue e farinhas de carne e ossos processadas no interior do estado de São Paulo;
- verificar a presença dos patógenos *Salmonella* spp. e *Clostridium perfringens*;
- realizar a sorotipagem das cepas de *Salmonella* spp. para caracterização do sorotipo.
- testar produto químico à base de formaldeído e ácidos orgânicos para controle de contaminação por *Clostridium perfringens*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de farinhas foram coletadas no período de fevereiro a agosto de 2010, no ponto final da produção de graxarias, com os devidos cuidados de assepsia e acondicionadas em sacos plásticos esterilizados. O transporte foi realizado em caixas isotérmicas para manter a temperatura e após cada coleta, as amostras foram levadas ao Laboratório de Anaeróbios, pertencente ao Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, para a realização das análises microbiológicas.

4.1 Caracterização da graxaria

Foram coletadas amostras em quatro diferentes estabelecimentos no interior do estado de São Paulo. Todos os estabelecimentos visitados apresentavam um profissional responsável pela produção e uma equipe de colaboradores que atuavam nos diversos pontos da produção. Em relação à infra-estrutura, as graxarias apresentavam padrões diversificados, entretanto, todas contavam com laboratório de apoio equipado para controle de qualidade dos produtos de origem animal, com estrutura para análises químicas, físicas e biológicas.

4.2 Isolamento dos microrganismos

4.2.1 Amostragem

Foram analisados três tipos de farinhas de origem animal, sendo elas, farinha de vísceras (FV), farinha de penas e sangue (FPS) e farinha de carne e ossos (FCO). Para cada tipo de farinha foram coletas 60 amostras, totalizando 180 amostras analisadas.

4.2.2 Diluição inicial

Foram pesados 25 g de cada amostra, transferidos e homogeneizados em um frasco tipo Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada a 1% estéril. A partir desta diluição inicial, foram realizadas as análises específicas para o cultivo de cada microrganismo (APHA, 2001)

4.2.3 *Salmonella* spp.

4.2.3.1 Enriquecimento seletivo

Para o isolamento de *Salmonella* spp. a solução da diluição inicial foi incubada à 42°C por 24h. Após esse período, de acordo com Apha (2001), 1mL de cada amostra foi transferido para dois tubos de ensaio, um contendo 10mL de caldo Selenito-cistina e outro contendo 10mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, ambos os meios adicionados de 0,1mL de novobiocina 4%, os quais foram incubados à 37°C e à 42°C, respectivamente, durante 24 horas.

4.2.3.2 Plaqueamento seletivo

A partir de cada caldo de enriquecimento seletivo, uma alçada foi utilizada para semeadura em superfície em duas placas, uma contendo ágar verde-brilhante vermelho de fenol-lactose-sacarose (BPLS) e outra contendo ágar Mac Conkey, incubados novamente à 37°C por 24 horas (BRASIL, 1993). A partir do ágar BPLS foram selecionadas colônias sugestivas, as quais são incolores, entre translúcidas e ligeiramente opacas, cujo meio básico apresentava tom maravilha; no ágar Mac Conkey foram selecionadas as colônias incolores com meio básico de cor palha.

4.2.3.3 Provas bioquímicas e sorotipagem

As colônias consideradas sugestivas foram semeadas em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) inclinado e Agar Lisina Ferro, ambos com incubação a 37°C por 24 horas. Após esse período, procurou-se observar na leitura a base ácida com gás e bisel alcalino com produção de H₂S, para o meio TSI; e cor inalterada, permanecendo púrpura, com ou sem produção de H₂S, para o Agar Lisina Ferro.

Os cultivos característicos foram submetidos ao teste sorológico de aglutinação rápida em lâmina. Para tal, foram adicionados 2 mL de solução salina ao cultivo do ágar TSI e, após homogeneização, foram depositadas duas gotas da suspensão em lâmina de vidro, acrescentando uma gota do soro salmonela polivalente somático sobre uma das gotas da suspensão, e sobre a outra, uma gota do soro Salmonella flagelar. Após homogeneização, procurou-se observar a ocorrência da aglutinação (BRASIL, 1993)

Quando confirmadas como positivas, apresentando aglutinação para os dois tipos de soro, foram semeadas em meio ágar nutriente, incubadas por 24 horas a 37°C e encaminhadas a Fundação Oswaldo Cruz para realização da sorotipagem.

4.2.4 *Clostridium perfringens*

4.2.4.1 Choque térmico

Para o isolamento de bactérias do gênero *Clostridium*, alíquotas das diluições iniciais de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaios, vazios e esterilizados, e foram submetidas a choque térmico. Neste procedimento, os tubos foram aquecidos em banho maria à 80°C por 10 minutos e, em seguida resfriados (AURELI et al., 1983). O choque térmico é um processo utilizado para que ocorra a esporulação do microrganismo a ser analisado e redução de contaminantes.

4.2.4.2 Plaqueamento Seletivo

Após o choque térmico, foi inoculado 1mL de cada amostra em placas de Petri contendo ágar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (SPS) em duplicata, e o plaqueamento foi realizado pelo método de “Pour Plate”. As placas foram incubadas em jarras anaeróbias com o sistema Gas Pack, à 37°C por até 72 horas (SEGNER et al., 1971). Colônias consideradas sugestivas por serem sulfito-redutoras positivas, as quais apresentavam coloração negra, foram transferidas para tubos de ensaio com tampas de rosca, para manter as condições de anaerobiose, contendo caldo BHI e incubadas à 37°C por 24 horas para realização das provas bioquímicas.

4.2.4.3 Provas bioquímicas

Para identificação do *Clostridium perfringens*, as culturas multiplicadas em BHI foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: prova da gelatinase, motilidade, fermentação de lactose, maltose, sacarose, salicina, produção de indol, nitrato e H₂S de acordo com Carter *et al* (1998). As amostras positivas para estes testes foram confirmadas como *Clostridium perringers*.

4.3 Teste de eficiência do produto químico

O produto químico utilizado neste estudo para realização do teste de eficiência no controle da contaminação por *Clostridium perfringens* foi o Salmex®, composto por formaldeído e ácidos orgânicos.

O teste não foi realizado com *Salmonella* pelo fato do produto já ser utilizado no combate deste microrganismo.

4.3.1 Amostragem

Para o teste da atividade inibidora do desenvolvimento bacteriano, foram utilizadas 12 amostras de farinhas tratadas, sendo quatro amostras de FCO, quatro de FPS e quatro de FV, além de 12 amostras controle, divididas da mesma forma, totalizando 24 amostras.

4.3.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir de um “pool” das colônias positivas e puras de *Clostridium perfringens* encontradas nas amostras analisadas na etapa de isolamento, bem como da bacterioteca do laboratório. As colônias foram repicadas em tubos com tampa de rosca, para manter anaerobiose, contendo caldo BHI, submetidas ao choque térmico e incubadas por 24 horas. A cultura obtida foi transferida para Erlenmeyer contendo BHI e foram incubadas por 24 horas à 37°C (DOWELL & HANKINS, 1968). Para a contagem do número de células bacterianas no inóculo, foi realizada uma diluição seriada até 10^{-6} (APHA, 2001). Em seguida, um mL de cada diluição foi semeado pelo método “Pour Plate” em PLacas contendo ágar SPS e incubadas em jaras anaeróbicas com o sistema Gas Pack a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem do número em unidades formadoras de colônias.

4.3.3 Preparo das amostras para teste

Cada uma das amostras foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 min, após e resfriamento receberam uma concentração de 10 mL/500 g do inóculo contendo 1×10^6 UFC/mL de *Clostridium perfringens* e ficaram incubadas em temperatura ambiente por 24h. Após esse período, todas as amostras, exceto as amostras controle, receberam o tratamento com o produto químico a base de formaldeído e ácidos orgânicos através de um equipamento trazido pela empresa e específico para homogeneização denominado Labmixer, a uma concentração de 6Kg/t, e foram novamente incubadas por 24 horas.

Em seguida, foram realizadas as contagens microbiológicas em dois períodos distintos, 24 horas e 5 dias após a realização do tratamento. A metodologia utilizada para contagem de *Clostridium perfringens* foi a mesma já descrita anteriormente.

4.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP. O tratamento estatístico descritivo foi feito mediante frequência simples e percentagens. Para a análise entre as variáveis independentes foi utilizado o programa SAS, versão 6.12, aplicando-se o Teste do Qui-Quadrado, com nível de significância de 1%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 180 amostras de farinhas analisadas quanto à presença de *Salmonella* spp., 41 (22,8%) apresentaram resultado positivo, sendo que das 60 amostras de FV, 8 (13,3%) foram positivas; das 60 amostras de FSP, 5 (8,3%) foram positivas e das 60 amostras de FCO, 28 (47,7%) apresentaram resultado positivo em relação à presença de *Salmonella* spp., como mostra a Tabela 1.

Uma investigação feita na Alemanha sobre a contaminação de rações e seus ingredientes, mostrou que 10% de todas as amostras analisadas estavam contaminadas por *Salmonella* spp. (VAHL, 2008). Esses resultados são inferiores aos obtidos neste trabalho, em que 22,8% apresentaram o microrganismo.

Santos et al. (2000) analisando farinhas de origem animal em Lavras, Minas Gerais, observaram que 90% das amostras estavam contaminadas por *Salmonella* e concluíram que a matéria prima é a principal fonte de veiculação do patógeno para as rações. Essa ocorrência, apesar de superior à descrita neste estudo, evidencia que o número de amostras fora dos padrões aceitos pela legislação ainda é elevado (BRASIL, 2008).

Zanotto (2007) em Santa Catarina, em estudo com FCO e flotado industrial (FI), que é a fase orgânica já separada do efluente de abatedouro e que pode ser utilizado na fabricação das FOA, descreve que não foi detectada a contaminação por *Salmonella* spp. em qualquer amostra analisada. Este resultado contrasta aos encontrados neste trabalho, em que todos os tipos de farinhas testadas apresentaram presença do microrganismo. Tais resultados evidenciam que dados envolvendo estudo com *Salmonella* spp. em farinhas de origem animal podem variar consideravelmente.

Segundo Anon (2007), em um monitoramento realizado pela indústria de rações da União Européia, foi observado que as farinhas de origem animal apresentavam contaminação pelo microrganismo *Salmonella*. Em 2005 foram encontrados 14,9% de positividade, entretanto, em 2006 houve uma redução para 8,3%.

Essa queda na contaminação pode ser explicada pelo fato de que, sendo *Salmonella* um microrganismo potencialmente patogênico de importância na indústria

alimentícia, principalmente em produtos avícolas, tem-se estimulado a busca de meios para reduzir *Salmonella* spp. antes do abate, através da alimentação animal, pois a redução das taxas de infecção pré-abate resulta em aumento na segurança dos produtos finais, conforme afirmam Funk et al. (2001).

Calixto et al. (2002) em estudo com 120 amostras de farinhas de origem animal em Goiânia, identificaram 25 positivas para *Salmonella* spp. Os autores ressaltam que a utilização de farinhas de origem animal como fonte de proteína na ração de frangos é viável, entretanto, afirmam que a produção desses subprodutos deve ser rigorosamente monitorada.

Resultados como estes reforçam a necessidade de maiores cuidados na produção de ingredientes que são incorporados a alimentação animal. O risco de contaminação existe tanto para os manipuladores desses produtos, quanto para os consumidores, pois segundo Calixto et al. (2002), a contaminação dos animais por *Salmonella* spp. pode chegar à carne e aos ovos. Tais fatos tornam estes produtos um risco potencial a saúde pública

Tabela 1. Número de amostras positivas para presença de *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp. de farinhas de carne e ossos (FCO), farinhas de sangue e penas (FSP) e farinhas de vísceras (FV).

Tipo de farinhas	<i>C. perfringens</i> (%)	<i>Salmonella</i> spp. (%)
FCO	22 (36,7)	28 (47,7)
FSP	33 (55)	5 (8,3)
FV	16 (26,6)	8 (13,3)
Total	71 (39,4)	41 (22,8)
Qui-quadrado <i>C. perfringens</i> = 10,3734 GL=2 p=0,00561 Qui-quadrado <i>Salmonella</i> spp.= 29,6263 GL=2 p <0,0001		

Das 180 amostras de farinhas analisadas, 71 (39,4%) apresentaram resultado positivo para presença de *Clostridium perfringens*, sendo que das 60 amostras de FV, 16 (26,6%) foram positivas; das 60 amostras de FSP, 33 (55%) foram positivas e das 60 amostras de FCO, 22 (36,7%) apresentaram resultado positivo em relação à presença de *Clostridium perfringens* (Tabela 1).

Zanotto (2007), em Santa Catarina, analisando farinha de carne e ossos e flotado industrial (FI), detectou a presença de *C. perfringens* em todas as amostras de FI. Entretanto, quando o FI foi incorporado a FCO e a mistura processada termicamente em digestor, a contaminação por *Clostridium perfringens* deixou de existir.

Embora o autor afirme que a queda na ocorrência seja em decorrência do processo de cocção, este resultado é diferente do encontrado no presente estudo, no qual os três tipos de farinhas analisados apresentaram *C. perfringens*. Esse fato pode ser explicado de duas formas, o microrganismo pode ter resistido ao tratamento térmico, que segundo García et al. (2001), é a característica mais importante do *C. perfringens* relativa à segurança alimentar. Ou ainda, podem ter ocorrido falhas durante o processamento.

Para reduzir possíveis falhas no processamento de produtos alimentícios e suas matérias primas, um dos pontos fundamentais é obedecer o binômio tempo x temperatura durante o tratamento térmico e evitar a formação de biofilmes nos equipamentos, através de sua correta higienização, como afirmam Rossi Junior et al. (2006)

Schocken-Iturrino et al. (2010) analisando rações para aves no interior do estado de São Paulo, encontraram 42% de positividade nas amostras em relação à presença de *C. perfringens*. Este resultado assemelha-se ao encontrado no presente estudo, em que 39,4% do total de amostras analisadas apresentaram resultado positivo (Figura 3). Os autores relatam que a frequência elevada pode estar associada à falta de higiene geral na manipulação e armazenamento dos mesmos.

Segundo Berchieri Junior & Macari (2000), análises microbiológicas realizadas em farinha de origem animal utilizadas em rações, têm demonstrado diversos níveis de

contaminação por *C. perfringens*. Os autores atribuem a presença do microrganismo às faltas de cuidados higiênicos durante o seu processamento.

Prió et al (2001) em estudo realizado na Espanha, analisaram a relação entre a contaminação por *Clostridium perfringens* presente em farinhas e na ração final. Os resultados apontaram a presença do microrganismo tanto na farinha quanto na ração, entretanto os autores não observaram correlação entre a incidência de contaminação nos produtos analisados, concluindo que a contaminação pode estar difundida em muitos materiais devido a sua característica de formar esporos.

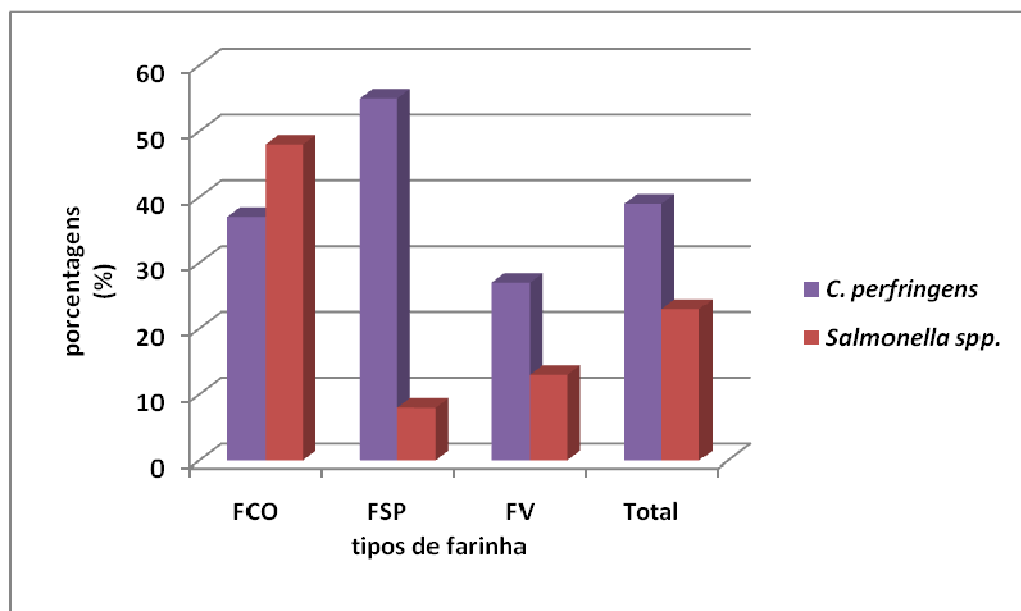


Figura 3. Resultados de amostras positivas para presença de *Salmonella* spp. e *C. perfringens* nos três tipos de farinhas analisados.

A sorotipagem das amostras positivas de *Salmonella* spp. realizada pela Fundação Oswaldo Cruz mostrou que das 41 cepas isoladas, 44% foram reconhecidas como *Salmonella* Montevideo, 22% como *Salmonella* Senftenberg, 20% *Salmonella* Infantis, 12% *Salmonella* Cerro e 2% *Salmonella* Typhimurium, como ilustra a Figura 4.

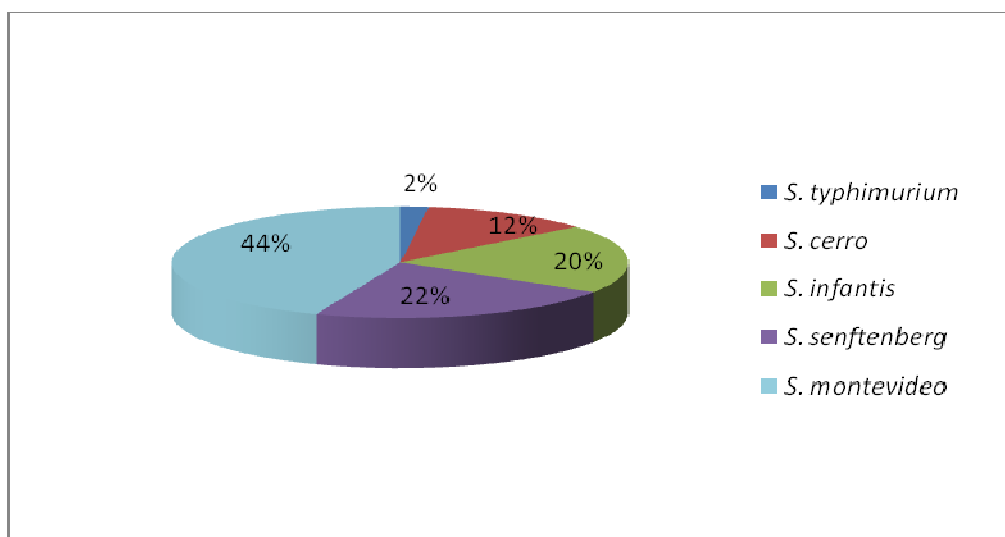


Figura 4. Porcentagem de sorovares de *Salmonella* identificados através da tipificação

Hofer et al. (1998) trabalharam com tipificação de *Salmonella* spp. isoladas de matérias-primas e rações isoladas em diferentes regiões do Brasil durante doze anos consecutivos. Das 2293 cepas, dez sorovares foram mais frequentemente reconhecidos, sendo pela ordem, *S. Montevideo*, *S. Senftenberg*, *S. Havana*, *S. Mbandaka*, *S. Tennessee*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Cerro* e *S. Bredeney*. Estes resultados assemelham-se com os obtidos no presente estudo, uma vez que a maior ocorrência também foi de *S. Montevideo* (44%) e *S. Senftenberg* (22%).

No Reino Unido, Corry et al. (2002) analisaram duas empresas durante quatro anos de pesquisa e acompanharam a prevalência de sorovares de *Salmonella* durante todas as etapas do sistema de produção avícola. Os autores afirmam que 55,4% dos sorovares de amostras isoladas de carcaças já processadas no abatedouro das aves são idênticas aos isolados obtidos na fábrica de rações. Dentre eles estavam os seguintes sorovares *S. Agona*, *S. Enteritidis*, *S. Kedougou*, *S. Mbandaka*, *S. Montevideo*, *S. Senftenberg*, *S. Typhimurium*

Três, dos sete sorovares tipificados no Reino Unido foram também isolados no presente estudo, mostrando que as fábricas de alimentos podem sim ser fontes de

contaminação por *Salmonella* em carcaças já processadas em abatedouros, conforme Corry et al. (2002) comprovaram.

Em trabalho semelhante Shirota et al (2001), no Japão, verificaram que 58,5% dos sorotipos isolados em ovos comerciais foram idênticos aos isolados observados na ração. Estes resultados confirmam que a boa qualidade microbiológica do alimento dos animais é fundamental para a saúde dos consumidores de produtos avícolas.

Segundo Santos (2003), identificar precisamente uma amostra é o ponto chave para o sucesso das investigações epidemiológicas, uma vez que a exata caracterização do agente é fundamental para relacionar a salmonelose em humanos e sua presença em aves ou produtos de origem avícola, visando prevenir surtos e erradicar suas origens.

A presença da *Salmonella* Typhimurium identificada neste trabalho chama atenção pelo fato deste sorovar estar diretamente ligado a contaminações de seres humanos veiculadas por produtos avícolas, tornando-os um risco à saúde pública (CORTEZ, 2006).

Segundo Warris-Versteegen & Van Vliet citados por Vahl (2008), *Salmonella* Typhimurium ainda é responsável por cerca de um terço das infecções por salmonelas nos seres humanos.

De um total de 180 amostras analisadas neste trabalho em relação à presença de *Salmonella* spp., 22,8% encontraram-se fora dos padrões regidos pela legislação (Figura 3), que estabelece ausência do microrganismo em 25 g do produto (BRASIL, 2008). Sabendo-se que o frango pode ser um reservatório deste microrganismo, o beneficiamento das farinhas de origem animal ocorreu de forma inadequada, sendo necessário um maior rigor no controle do processamento.

A legislação que estabelecia limites para contagens de *Clostridium perfringens* em subprodutos de origem animal (BRASIL, 2003) foi revogada e, a Normativa vigente sequer cita o microrganismo (BRASIL, 2008). Isso pode ter ocorrido pelo fato de que este seja um patógeno esporulado, resistente e de difícil controle. Entretanto, uma vez que sua presença foi observada com valores tão significativos, e sabendo-se que sua

contaminação é indesejada, trabalhos envolvendo a inibição de *Clostridium perfringens* tornam-se importantes e, acima de tudo, necessários.

O produto a base de formaldeído e ácidos orgânicos mostrou-se eficiente em relação a diminuição da contaminação por *Clostridium perfringens*. Como observado na Tabela 2, as amostras controle em ambas as farinhas apresentaram uma contagem com variação entre $2,3 \times 10^5$ a $5,3 \times 10^6$ UFC/g em 24h de incubação. Já as amostras tratadas FCO e FSP não apresentaram desenvolvimento bacteriano, com exceção das amostras FV, que apresentaram uma variação de zero a $2,6 \times 10^4$ UFC/g.

Tabela 2. População de *Clostridium perfringens* em amostras de farinhas de origem animal tratadas com formaldeído e ácidos orgânicos e amostras controle após 24 horas de incubação.

Amostra	Controle	UFC/g	Tratada	UFC/g
1	FCO	$3,1 \times 10^5$	FCO	0
2	FCO	$5,1 \times 10^5$	FCO	0
3	FCO	$5,4 \times 10^5$	FCO	0
4	FCO	$4,3 \times 10^5$	FCO	0
5	FSP	$3,3 \times 10^5$	FSP	0
6	FSP	$6,3 \times 10^5$	FSP	0
7	FSP	$3,6 \times 10^5$	FSP	0
8	FSP	$2,3 \times 10^5$	FSP	0
9	FV	$2,3 \times 10^6$	FV	0
10	FV	$3,6 \times 10^5$	FV	$1,9 \times 10^4$
11	FV	$5,3 \times 10^6$	FV	2×10^4
12	FV	$3,7 \times 10^6$	FV	$2,6 \times 10^4$

FCO Farinha de Carne e Ossos
 FSP Farinha de Sangue e Penas
 FV Farinha de Vísceras

A presença do microrganismo após 24 horas em um dos tipos de farinha analisadas pode ser explicado pelo fato de que a eficiência dos agentes químicos no controle de contaminantes depende do contato do organismo com o produto, que pode variar com a dose aplicada e com o tempo de exposição ao produto (LONGO et al., 2010). E, segundo Arts et al. (2006), o formaldeído é o agente químico menos provável de ser inativado pela matéria orgânica, porém, requer várias horas para atingir o seu pleno efeito.

Entretanto, se for levado em consideração que, dos três tipos de farinha analisados, em apenas um deles o produto não foi capaz de eliminar 100% o patógeno, o motivo pode ser devido à textura das amostras. Dos três tipos de farinhas, somente a FV apresentava grumos compactados, enquanto FCO e FSP eram fareladas. Esta característica pode ter dificultado a penetração do produto, pois segundo Bellaver (2002), a granulometria e a textura das farinhas de origem animal influenciam diretamente a qualidade microbiológica das mesmas.

Após cinco dias de incubação, as amostras controle em ambas as farinhas apresentaram uma contagem com variação de $2,1 \times 10^5$ a $2,2 \times 10^6$ UFC/g. Em contrapartida, todas as amostras dos três tipos de farinhas tratadas apresentaram quedas acentuadas na presença, sendo observada a ausência total de crescimento microbiano, como observado na Tabela 3.

Tabela 3. População de *Clostridium perfringens* em amostras de farinhas de origem animal tratadas com formaldeído e ácidos orgânicos e amostras controle após 5 dias de incubação

Amostra	Controle	UFC/g	Tratada	UFC/g
1	FCO	$2,7 \times 10^5$	FCO	0
2	FCO	$2,1 \times 10^5$	FCO	0
3	FCO	$2,3 \times 10^5$	FCO	0
4	FCO	$5,3 \times 10^5$	FCO	0
5	FSP	$2,3 \times 10^5$	FSP	0
6	FSP	$5,4 \times 10^5$	FSP	0
7	FSP	$4,4 \times 10^5$	FSP	0
8	FSP	$7,3 \times 10^5$	FSP	0
9	FV	$6,4 \times 10^5$	FV	0
10	FV	$4,8 \times 10^5$	FV	0
11	FV	$3,7 \times 10^5$	FV	0
12	FV	$2,2 \times 10^6$	FV	0

FCO Farinha de Carne e Ossos

FSP Farinha de Sangue e Penas

FV Farinha de Vísceras

Em um estudo com um produto a base de formaldeído e ácido propiônico, Richardson citado por Longo (2010), observou que sua utilização a uma concentração de 2 Kg/t foi eficiente na redução da contaminação por células vegetativas de *Clostridium sp* em rações fareladas. Os níveis avaliados dessa combinação reduziram, mas não foram suficientes para eliminar a contaminação em sua forma esporulada.

Estes resultados divergem dos encontrados no presente estudo, em que houve completa eliminação do patógeno esporulado, evidenciando que produto químico à base de formaldeído e ácidos orgânicos quando utilizados na matéria prima, a concentração de 6 Kg/t é mais eficiente que se utilizados na ração a uma menor concentração.

Esse fato pode ser explicado de duas maneiras. A primeira é que, a uma maior concentração, obviamente as chances das células bacterianas resistirem é menor. Concentração esta que não é permitida em rações, somente em suas matérias primas

(ANITOX, 1998). Outro fato é que, com a aplicação do produto diretamente na matéria prima, e não nas rações, o processo de cocção existente durante o processamento já reduz os contaminantes, aumentando a integração bactéria-produto e garantindo maior eficácia (WALES, 2010).

Na revisão realizada não foram encontrados outros trabalhos envolvendo o estudo de produtos químicos na inibição do crescimento de *Clostridium perfringens*. Assim, optou-se por discutir os resultados encontrados com autores que analisaram produtos químicos no controle do crescimento de *Salmonella*, bem como tratamento térmico na inibição de *Clostridium perfringens*.

Rezende et al. (2008) trabalharam com avaliação da eficiência de diferentes concentrações de ácido acético em reduzir *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* de rações. Os resultados mostraram que nenhuma das concentrações de ácido testadas foram capaz de reduzir os sorovares analisados. Barnhart et al. (1999) mencionaram um modelo in vitro de utilização de formaldeído em ração para consumo animal e os resultados encontrados apontaram uma redução significativa de *Salmonella*.

Resultados como os de Rezende et al. (2008) e de Barnhart et al. (1999) são diferentes dos obtidos no presente trabalho, em que houve a eliminação total do microrganismo analisado. Isso salienta a importância de associações entre dois ou mais produtos químicos para garantia da eficiência em relação a eliminação de patógenos, (LONGO et al., 2010), bem como redução de problemas com volatilidade, corrosão e palatabilidade (WALES, 2010).

Segundo Carrique-Mas et al. (2007), produtos à base de formaldeído associados a outros agentes químicos têm apresentado resultados satisfatórios para descontaminação de rações que foram inoculadas artificialmente com *Salmonella*.

Mazutti et al. (2010) avaliaram dois métodos de esterilização de farinhas de origem animal. Um processo em escala piloto, com equipamento de 150 kg de capacidade, e outro em escala industrial, com equipamento de 3.000 kg de capacidade, ambos com injeção de vapor saturado. Em relação à eliminação de *Clostridium perfringens*, o processo em escala piloto foi ineficiente, apresentando contagens de até

$6,0 \times 10^2$ UFC/mL, e o processo em escala industrial reduziu, mas não eliminou o microrganismo, que apresentou contagens de até $9,8 \times 10^1$ UFC/mL. Esse resultado mostra que o tratamento térmico é menos eficiente quando comparado ao tratamento químico utilizado no presente estudo, em que foi observada a eliminação total do patógeno..

O efeito da tolerância à temperaturas sobre os aspectos de segurança alimentar animal e humana são fundamentais, pois aplicações de tratamentos térmicos podem não ser eficientes no controle de patógenos esporulados (García et al., 2001), evidenciando que a utilização de outros meios para inibição do crescimento de *Clostridium perfringens*, como tratamentos químicos, devem ser levados em consideração.

Uma vez que a qualidade microbiológica de subprodutos de origem animal é um fator preponderante para utilização destes em rações, a fiscalização é um ponto chave. Entretanto, existe um descaso na legislação em relação à presença de *Clostridium perfringens* em produtos de origem animal. Como sugestão, seria interessante a re-elaboração de Normativas incluindo padrões para este microrganismo, pois sua presença é indesejável e, a partir de agora, comprovadamente, existem produtos capazes de inibir seu desenvolvimento.

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

- Foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em valores significativos, evidenciando que tais amostras estão fora dos padrões aceitos pela legislação;
- Especialmente pela presença de *S. tythimurium* nas amostras analisadas, as farinhas de origem animal podem ser consideradas um risco potencial à saúde pública;
- Foi encontrada a presença de *C. perfringens*, demonstrando assim uma deficiência durante processamento dos produtos;
- Tais resultados evidenciam que o tratamento térmico aplicado foi ineficiente ou houve uma recontaminação do produto;
- A produção de farinhas de origem animal é um sub-setor que necessita de aportes tecnológicos ;
- O produto químico a base de formaldeído e ácidos orgânicos foi eficiente para eliminar o *C. perfringens*
- A existência e comprovação de produto químico capaz de controlar o patógeno é um grande avanço para a avicultura.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRONEGÓCIO/ Pecuária - Avicultura / Notícia. 2010. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=42528> . Acesso em 14 de agosto de 2010.

ALLEN, P. C. Effects of formaldehyde fumigation of housing on carotenoid pigmentation in 3 breeds of chickens. **Poultry Science**, 72:1040-1045, 1993.

ANDERSEN, H. J., OKSBJERG, N.; THERKILDSEN M. "Potential quality control tools in the production of fresh pork, beef and lamb demanded by European society." **Livestock Production Science**, v. 94, p.105-124, 2005

ANDERSON, R. C.; ZIPPRIN, R. L. **Bacteriology of *Salmonella***. In: **FOODBORNE DISEASE HANDBOOK**, 2nd edition. Hui, H. Y., M. D. Pierson and J. R. Gorham (eds.). Marcel Dekker Inc.: New York, NY. 2002, v. 1, p. 247 – 263.

ANITOX, 1998. Termin-8R antimicrobial preservative can now be used in all types of animal feeds and feed ingredients. Disponível em <http://www.anitox.com/tech%20sheet%202008/Termin8%20Salmex%20intl%20tech%20sheet%20tx8i.t911-5%20073108.pdf>>. Acesso em 20 de janeiro de 2011.

ANON, 2007. Evaluation of the measures to control *Salmonella* in the feed sector 2006. Product Board Animal Feed. Disponível em: <http://www.pdv.nl>. Acesso em: 15 de agosto de 2010.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological of foods**. 4th ed. Washington, 2001.

ARTS, J. H. E.; RENNEN M.A.J.; de HEER, C. Inhaled formaldehyde: evaluation of sensory irritation in relation to carcinogenicity. **Regul. Toxicol. Pharmacol**, 44:144-160, 2006.

AURELI, P.; FERRINI, A.; NEGRI, S. Ricerca delle spore di *Clostridium botulinum* nel miele. **La Revista Società Italian Science Alimentari**, Pinerolo, v. 12, n. 6, p. 457-460, 1983.

AWAD, M. M.; ELLEMOR, D. M.; BOYD, R. L.; EMMINS, J. J.; ROOD, J. I. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*- mediated gas gangrene. **Infect. Immun**. 69:7904–7910, 2001.

BARNHART, E.T.; CALDWELL D.J.; CROUCH M.C.; BYRD J.A.; CORRIER D.E.; HARGIS, B.M. Effect of lactose administration in drinking water prior to and during feed withdrawal on *Salmonella* recovery from broiler crops and ceca. **Poultry Science**, 78: 211-214, 1999.

BARROW, P. A. Salmonella - present, past and future. **Avian Pathology**, v.22, p.651-669, 1993.

BELLAVER, C. A qualidade dos ingredientes e dos itens importantes na produção de rações. **Revista A Lavoura**. p.13-15. 2002.

BELLAVER, C. Processamento de farinhas de origem animal e sua relação com digestibilidade e palatabilidade do produto final. In: II CONGRESSO INTERNACIONAL E IX SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2010, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: 2010, p.1-10.

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**, Ed. FACTA, Campinas – SP, 2000. p. 333-338.

BLASCHEK, H.P, SOLBERG, M. Isolation of a plasmid responsible for caseinase activity in *Clostridium perfringens* ATCC 3626B. **J. Bacteriol.** 147:262–666, 1981.

BIGNARDE, J. M. P.; MONTEIRO, M. E. Z.; BERTOZZO, D. T.; FREITAS, R. E., PEREIRA, R. E. P. Enterite Necrótica em Aves. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, n. 11, 2008. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria11/revisao/edic-vi-n11-RL41.pdf> . Acesso em: 18 de dezembro de 2010.

BRASIL. Portaria n. 100, de 10 de agosto de 1993. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção I, n. 156, p. 11950, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 15, de 29 de outubro de 2003. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos que processam resíduos de animais destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, 30 de outubro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa MAPA nº 34, de 28 de maio de 2008. Regulamento técnico da inspeção higiênico-sanitária e tecnológica do processamento de resíduos de origem animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 de maio de 2008.

CALIXTO, A. E. R.; SERAFINI, A. B.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 56-62, 2002.

CARRIQUE-MAS, J. J., BEDFORD, S.; DAVIES, R. H. Organic acid and formaldehyde treatment of animal feeds to control *Salmonella*: efficacy and masking during culture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 88-96, 2007.

CARTER, G. R. et al. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. 3.ed. São Paulo: Roca, 1998. 249 p.

CATO, E. P.; GEORGE, W. L.; FINEGOLD, S.M. Genus *Clostridium*. In: Sneath, P. (ed). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams e Wilkins. 1986, v. 2, p. 1179- 1182.

CORTEZ, A. L. L. **Disseminação de bactérias dos gêneros Campylobacter e Salmonella na linha de abate de aves**. 2006. 80 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

CORRY, J. E. L.; ALLEN, V. M.; HUDSON, W. R. BRESLIN, M. F. DAVIES, R. H. Sources of salmonella on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. **Journal of Applied Microbiology** , Reino Unido, v. 92, p. 424-432, 2002.

COSTA, D. P. S, ROMANELLI, P. F.; TRABUCO E. Aproveitamento de vísceras não comestíveis de aves para elaboração de farinha de carne. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(3): 746-752, 2008

D'AOUST, J. Y. Salmonella. In: DOYLE M. P. **Food New York**. Marcel Dekker, 1989. cap.9, p.327-445.

D'AOUST,J.Y. "*Salmonella* and the international food trade." **International Journal of Food Microbiology**. 1994, 24:11-31.

DAVIES, R.; BRESLIN, M.; CORRY, J. E.; HUDSON, W.; ALLEN V. M. Observations on the distribution and control of *Salmonella* species in two integrated broiler companies. **Vet. Rec**, 149:227-232, 2001

DAVIES, R. H.; WRAY, C. Observations on disinfection regimens used on *Salmonella enteritidis* infected Poultry Units. **Poultry Science** 74: 638-647, 1995.

DEKICH, M. A. Broiler industry strategies for control of respiratory and enteric diseases. **Poultry Science**, v.77, p.1176-1180, 1998.

DOWELL, V.R.; HAWKINS, T.M. **Laboratory methods in anaerobic bacteriology**. New York: U.S. Dep. Health, Educations and Welfare, 1968. 1803p.

ESTEVES, A.S.M.F. **Perigos microbiológicos em alheira Principais vias de contaminação por *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* spp.** 2005. 258 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2005.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to use of formaldehyde as a preservative during the manufacture and preparation of food additives. **The EFSA Journal**, 415, 1-10, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion of the panel on biological hazards on a request from health and consumer protection, Directorate General, European Comission on Microbiological Risk Assestment in feedingstuffs for food-producing animals. **The EFSA Journal**, 720, 1- 84, 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). The Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. **The EFSA Journal**, 223, 14-94, 2009.

FARMLAND. 2001 Disponível em:

<http://www.farmland.com/feed_ingredients/index.html >

FIGUEIREDO, E. A. P. **Como está a avicultura brasileira**. Revista Brasileira de Agropecuária, ano II nº 13. 2001. p.12-16. 2001

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

FUNK, J. A.; DAVIES, P.R.; NICHOLS, M.A. Longitudinal study of *Salmonella* enterica in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. **Veterinary Microbiology**, n.83, p.45-60, 2001.

GARCÍA, S.; LIMÓN, J. C.; HEREDIA, N. M. Cross protection by heat and cold shock to lethal temperatures in *Clostridium perfringens*. **Brazilian Journal of Microbiology**, México, v. 32, p. 110-112, 2001

GAWANDE,P.V., BHAGWAT, A. A. "Inoculation onto solid surfaces protects *Salmonella* spp. During acid challenge: a model study using polyethersulfone membranes." **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 86-92, 2002.

GIL de los SANTOS, J. R.; CONCEIÇÃO F. R.; GIL-TURNES, C. Enterite necrótica aviária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2076-2082, 2008.

GOMES, A. M.; LOBATO, F.C.F.; MARTINS, N.R.S.; ASSIS, R.A. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, Santa Maria, p. 1943 – 1947, v.38, n.7 Oct. 2008.

HINTON, M., LINTON, A. H. Control of salmonella infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. **Vet. Rec.**, 123:416-421, 1988.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Sorovares de Salmonella isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 18(1), p 21-27, 1998.

KEYBURN, A. L.; SHEEDY, S. A.; FORD, M. E.; WILLIAMSON, M. M.; Awad, M. M.; ROOD, J. I.; MOORE R. J. Alpha-Toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6496–6500, 2006.

KHAN, M. Z.; ALI, Z.; MUHAMMA, D. G.; KHAN, A.; MAHMOOD, F. Pathological effects of formalin (37% formaldehyde) mixed in feed or administered into the crops of White Leghorn cockerels. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 50, p.354-358, 2003.

LINDER, C. E. **Salmonella spp. em sistema intensivo de criação de peixes tropicais de água doce**. 2002. 49 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

LOBATO, F.; ASSIS, R. A. Clostridioses dos animais. In: simpósio mineiro de buiatria, 2., 2005. Associação de buiatria de Minas Gerais (ABMG).

LONGO, F. A.; SILVA, I. F.; LANZARIN, M. A. A importância do controle microbiológico em rações para aves. In: XI SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVUCULTURA, 2010, Chapecó, SC. **Anais...**Chapecó: 2010, p-1-23.

LOVLAND, A.; KALDHUSDAL, M. Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. **Avian Pathology**, v. 30, p. 73–81, 2001.

MAZUTTI M. A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Esterilização de farinha de subprodutos animais em esterilizador industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, n.1, p.48-54, 2010.

MOUSTAFA, G. Z.; ZAKI, M. M.; BADAWY, E. M. Hygienic control of *Salmonella* in artificially contaminated feed. **Veterinary Medical Journal**, v. 50, p. 239-246, 2002.

NUNES. R. V.; POZZA, P. C.; NUNES, C. G. V.; CAMPESTRINI, E.; KÜHL, R.; ROCHA, L. D. DA; COSTA, F. G. P. Valores Energéticos de Subprodutos de Origem Animal para Aves. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.4, p.1217-1224, 2005.

POPPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000 (n.44) to the Kauffmann-White scheme. **Research Microbiology**, v.152, n.10, p.907-909, 2001.

PRIÓ P.; GASOL, R.; SORIANO, R. C.; PEREZ-RIGAU A. Effect of raw material microbial contamination over microbiological profile of ground and pelleted feeds. In: BRUFAN J. (Ed.): From Feed to Food, p. 197-199, 2001.

REZENDE, C.S.M.; MESQUITA, A.J.; ANDRADE, M.A.; STRINGHINI, J.H.; CHAVES, L.S.; MINAFRA, C.S.; LAGE, M.E. Ácido acético em rações de frangos de corte experimentalmente contaminadas com *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella Typhimurium* **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.9, n.3, p. 516-528, 2008.

RICKE, S.C., KUNDINGER, M.M; MILLER, D.R.; KEETON, J.T. Alternatives to antibiotics chemical and physical antimicrobial interventions and foodborne pathogen response. **Poultry Science**, v. 84, p. 667 – 675, 2005.

ROOD, J. I. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. **Annu. Rev. Microbiol.**,v. 52, p. 333–360, 1998.

ROSSI JR. O.D.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; SALOTTI, B.M.; BURGER, K.P.; CARDOZO, M.V.; CORTEZ, A.L.L. Estudo das características microbiológicas do leite UAT ao longo de seu processamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.27-32, 2006.

SANTOS, L. R. Padronização da RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) para caracterização molecular de *Salmonella* Enteritidis. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana**, Uruguaiana, v. 10, p. 72-86, 2003.

SANTOS, E.J.; CARVALHO, E.P.; SANCHES, R.L.; BARRIOS, B.E. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no estado de Minas Gerais para produção de ração animal. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.425-433, 2000.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P; ISHI, M. Clostridioses em aves. In: BERCHIERI Jr, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. Cap.4.6, p.242-243.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; VITTORI, J.; BERALDO-MASSOLI, M.C.; CHIODA-DELPHINO, T.P.; DAMASCENO, P.R. *Clostridium perfringens* em rações e águas fornecidos a frangos de corte em granjas avícolas do interior paulista – Brasil. **Ciência Rural**, v.40, n.1, Santa Maria, 2010.

SEGNER, W.P.; SCHIMIDT, C.F.; BOLTZ, J.K. Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity and toxin production of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C. **Applied Microbiology**, Washington, v. 22, p. 1025-1029, 1971.

SHIROTA, K. H.; SATOH, T.; MURASE, T.; OTSUKI, K. Monitoring of Layer Feed and Eggs for *Salmonella* in Eastern Japan between 1993 and 1998. **J. Food Prot**, v. 64, p. 734-737, 2001.

SILVA, E. P. **Avaliação nutricional de farinhas de Visceras de aves e a utilização em rações de frango de corte**. 2009. 135 f. Dissertação (Magister Scientiae em Nutrição de Não Ruminantes) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 2009.

SIQUEIRA, R. S.; DODD, C. E. R.; REES, C. E. D. Phage amplification assay as rapid method for *Salmonella* detection. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 118-120, 2003.

THONG, K.L.; GOH, Y.L.; RADU, S.; NOORZALEHA, S.; YASIN, R.; KOH, Y. T.; LIM, V. K.; RUSUL, G.; PUTHUCHEARY, S. D. Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Salmonella* enterica serotype Weltevreden isolated in Malaysia. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 2498-2503, 2002.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P.A.D.; GARRITY, G.M.; EUZEBY, J.P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 521 – 524, 2005.

VAHL, H. A. Verbetering van de *Salmonella*-status van pluimveebedrijven door voedingsmaatregelen, een literatuurstudie **Feed and Health**. Consultancy for animal feed & healthy livestock, p. 16-57, 2008.

VAN IMMERSEEL, F.; FIEVEZ, V.; de BUCK, J.; PASMANS, F.; MARTEL, A.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella* Enteritidis in young chickens. **Poultry Science**, v. 83, p. 69–74, 2004.

VAN DER SLUIS, W. Clostridial enteritis is an often underestimated problem. **World Poultry**, v.16, n.7, p.42-43, 2000.

VESTBY L. K. 2010. Why is it so difficult to eradicate salmonella?Disponível em:<<http://www.sciencedaily.com/releases/2010/02/100202103928.htm>>. Acesso em 13 de janeiro de 2011.

VIDAL MARTINS, A.M.C.; ROSSI JUNIOR, O.D.; SALOTTI, B.M.; BURGER, K.P.; CORTEZ, A.L.L., CARDOZO, M.M. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, p.295-298, 2008.

WALES, A.D et al. Chemical treatment of animal feed and water for the control of *Salmonella*. **Foodborne Pathogens and Diseases**, 2010. v 7, n.1, p.3-15.

ZANOTTO, D. F.; KICH, J. D.; BELLAYER, C.; SANTIANI, M. J.; LOCATELLI, C.; TRIQUES, N. J. **Embrapa Suínos e Aves**. Avaliação Microbiológica da Farinha de Carne e Ossos Contendo Flotado Industrial de Frigorífico. Concórdia, SC, 2007. (Comunicado Técnico, 464). Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_t0g37i5s.pdf>. Acesso em 5 de outubro de 2010.