

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**Avaliação microbiana e cor de carcaças *Bos indicus* tratadas
com diferentes soluções de ácido láctico**

RENATA LEONARDO LOMELE

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
título de Doutor.

**Botucatu, SP
Janeiro de 2018**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**Avaliação microbiana e cor de carcaças *Bos indicus* tratadas
com diferentes soluções de ácido láctico**

RENATA LEONARDO LOMELE
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça
Co-orientador: Dr. Guilherme Sicca Lopes Sampaio

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
título de Doutor.

**Botucatu, SP
Janeiro de 2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

L845a Lomele, Renata Leonardo, 1987
Avaliação microbiana e cor de carcaças *Bos indicus* tratadas com diferentes soluções de ácido láctico / Renata Leonardo Lomele. - Botucatu: [s.n.], 2018
64 p.: ils., grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2018
Orientador: Roberto de Oliveira Roça
Coorientador: Guilherme Sicca Lopes Sampaio
Inclui bibliografia

1. Bovino de corte - Carcaças. 2. Ácidos orgânicos. 3. Descontaminação. I. Roça, Roberto de Oliveira. II. Sampaio, Guilherme Sicca Lopes. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

Elaborada Ana Lucia G. Kempinas - CRB-8:7310

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

Dedicatória

Ao meu pai, a minha mais intensa saudade,

À minha mãe, o meu mais puro amor,

Ao meu irmão, o meu maior orgulho.

Agradecimentos

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade concedida de estudar em um curso de excelência.

Ao meu orientador e amigo, Professor Doutor Roberto de Oliveira Roça, que me apoiou desde a graduação, me mostrando os melhores caminhos a serem percorridos. Para mim, realizar o doutorado sob sua orientação, foi a realização de um grande sonho. Sou imensamente agradecida por tudo que aprendi com o senhor, e pela oportunidade que o senhor me deu.

Ao amigo Guilherme Sampaio, por todos os ensinamentos, conselhos, paciência e amizade, acima de tudo.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ, Seila, Ellen e Cláudia pelos serviços prestados.

À empresa JBS por viabilizar a execução deste projeto, em especial as senhores: Bassem AKI AKI, Camila Brossi e Luciana Mena, por disponibilizar toda estrutura para execução desta pesquisa e todo apoio para que este estudo ocorresse.

Ao meu namorado, Guilherme, por todo carinho e amor em todos os dias.

À Natália Leal, por tantos anos de amizade, convivência e carinho, e pela imensa ajuda durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus amigos da "Equipe Roça", Carol, Nara, Nátaly, Bruna e Bruno, sem os quais o dia a dia da pesquisa não seria o mesmo. Obrigada pelas risadas, pela ajuda, pelos momentos de descontração e por tudo que aprendi com vocês.

À todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste sonho que hoje concretizo.

E, finalmente, à minha mãe Vera Lúcia e ao meu irmão Rodrigo, pelo apoio incondicional, motivação, amor, e, acima de tudo, por serem a razão do meu viver.

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
INTRODUÇÃO	2
1 BOVINOCULTURA DE CORTE NO BRASIL	2
2 MICROBIOLOGIA DA CARNE BOVINA	3
2.1 MICRORGANISMOS INDICADORES HIGIÊNICO-SANITÁRIOS	5
2.1.1 Bactérias mesófilas	5
2.1.2 Bactérias psicrótróficas	6
2.1.3 Bactérias da família Enterobacteriaceae	7
2.1.4 Bactérias ácido-láticas	7
2.1.5 <i>Escherichia coli</i> patogênicas	8
3 ÁCIDO LÁTICO	10
3.1 ÁCIDO LÁTICO NA DESCONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS BOVINAS	11
3.2 ÁCIDO LÁTICO E A COR DA CARNE BOVINA	12
4 OBJETIVOS	14
5 REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2	23
RESUMO	24
ABSTRACT	26
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 Seleção das meias carcaças esquerdas	29
2.2 Aplicação do ácido lático	32
2.3 Procedimentos realizados nas meias carcaças esquerdas	33
2.3.1. Amostragem e análises microbianas	33
2.3.2. PCR quantitativa	34
2.3.2.1 Gene normalizador da etapa de extração do DNA	34

2.3.2.2 Extração do DNA	35
2.3.2.3 Curva padrão e controles negativos das análises	35
2.3.2.4 Análise qualitativa dos genes alvo	36
2.3.3. Avaliação da cor instrumental.....	36
2.4 Análise estatística.....	37
3 RESULTADOS	41
3.1 Indicadores higiênico-sanitários	41
3.1.1 Análise global (estudos 01 e 02) – Antes do Resfriamento	41
3.1.2 Resultados do Estudo 01.....	42
3.1.3 Resultados do Estudo 02.....	48
E. coli STEC e EPEC.....	51
3.2 Avaliação da cor instrumental	51
4 DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÃO	57
6. REFERÊNCIAS.....	57
CAPÍTULO III	63
IMPLICAÇÕES	64

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Fluxograma da colheita e processamento das amostras de meias carcaças bovinas – Estudo -01.	30
Figura 02 - Fluxograma da colheita e processamento das amostras de meias carcaças bovinas – Estudo 02.	31
Figura 03 - Valor do parâmetro de Luminosidade (L), com Intervalo de Confiança (95%), para a gordura de cobertura da região da paleta e da picanha da superfície das carcaças aspergidas com diferentes concentrações de ácido láctico.	52
Figura 04 – Valor do parâmetro de intensidade do vermelho (a^*), com Intervalo de Confiança (95%), para região da paleta e da picanha da superfície das carcaças aspergidas com diferentes concentrações de ácido láctico.	52
Figura 05 - Valor do parâmetro de intensidade de amarelo (b^*), com Intervalo de Confiança (95%), para região da paleta e da picanha da superfície das carcaças aspergidas com diferentes concentrações de ácido láctico.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Descrição dos iniciadores utilizados (“primers”)	40
Tabela 2 - Equação linear para predição da contagem em $\log_{10}$ UFC/cm ² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com solução de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento	41
Tabela 3 - Razão de chances e ocorrência ajustada dos grupos bacterianos nas meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento	42
Tabela 4 - Razão de chances e ocorrência ajustada dos grupos bacterianos nas meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas após 24 horas de resfriamento	44
Tabela 5 - Equação linear para predição da contagem em $\log_{10}$ UFC/cm ² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com solução de ácido láctico	45
Tabela 6 - Média de contagem em $\log_{10}$ UFC/cm ² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico.....	46
Tabela 7 - Média de contagem em $\log_{10}$ UFC/cm ² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes e após 24 horas de resfriamento	47
Tabela 8 - Razão de chances e ocorrência ajustada dos grupos bacterianos nas meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento	48
Tabela 9 - Ocorrência descritiva dos grupos bacterianos nas meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento	49
Tabela 10 - Equação linear para predição da contagem em $\log_{10}$ UFC/cm ² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com solução de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento	50
Tabela 11 - Média de contagem em $\log_{10}$ UFC/cm ² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento	51

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

INTRODUÇÃO

A produção de carne com qualidade satisfatória depende, entre outros fatores, dos controles de perigos físicos, químicos e biológicos, que estão associados desde a criação do animal até a oferta da carne e seus produtos aos consumidores. Durante os procedimentos de abate, principalmente a esola e a evisceração, as carcaças bovinas estão expostas à contaminação por pelos, fezes, sujidades veiculadas pelo ar, manipuladores, equipamentos e utensílios, representando um risco para a inocuidade alimentar.

Devido ao desperdício de alimentos e perdas econômicas por parte das empresas processadoras de carne em decorrência da deterioração, somado ao impacto na saúde pública ocasionado pela contaminação com bactérias patogênicas, é de grande importância que a produção da carne seja focada na garantia da qualidade, contemplando os controles indicados pela legislação, assim como o uso de medidas adequadas.

Um dos métodos utilizados na redução destes contaminantes, aliados às Boas Práticas de Fabricação, é a aspersão de ácidos orgânicos, como o ácido láctico. Embora inúmeros estudos sobre a utilização de ácido láctico como sanificante em carcaças bovinas já tenham sido realizados, existe uma carência de estudos que considerem o sistema produtivo brasileiro, representado principalmente por *Bos indicus*, de forma a determinar a concentração, a temperatura, o volume e o tempo de contato necessários na operação de descontaminação.

Perante estes aspectos, o objetivo do presente trabalho foi determinar a eficácia da descontaminação de carcaças *B. indicus*, pelo uso da aspersão de diferentes concentrações de ácido láctico, sobre a condição microbiana inicial e sua influência nos aspectos sensoriais da carcaça.

1 BOVINOCULTURA DE CORTE NO BRASIL

A pecuária de corte no Brasil se destaca como uma das mais expressivas atividades do agronegócio. O país possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 209,1 milhões de animais, sendo que em 2015 foram abatidos 39,16 milhões de cabeças, representando a produção de 9,56 milhões de

toneladas equivalente-carcaça. A exportação neste mesmo ano foi de 1,88 milhão de toneladas equivalente carcaça, representando 19,63% da produção, alcançando a posição de segundo maior produtor e exportador de carne bovina. O país também se caracteriza por ser o segundo maior consumidor de carne bovina mundial, e o mercado interno foi responsável por consumir 81% da carne produzida no Brasil em 2015 (ABIEC, 2016).

Conhecer a realidade das condições de criação, manejo e sistema produtivo nacional se faz importante para a execução adequada dos estudos brasileiros. Em 2015 apenas 13% dos bovinos abatidos foram terminados em confinamento (ABIEC, 2016). Do rebanho nacional, mais de 80% é composto por animais de raças zebuínas (*Bos indicus*), puros ou cruzados, sendo que aqueles com características da raça Nelore representam quase a totalidade desses animais (FERRAZ; FELÍCIO, 2010).

Dentre as diferenças apresentadas entre animais zebuínos e taurinos, a pelagem se destaca, pois poderia influenciar na contaminação da carcaça. Um estudo relata que raças com pelos mais longos (por exemplo, Simental), têm maior potencial para apresentarem a carcaça contaminada (DAVIES et al., 2000). Além disso, a característica genética é um fator importante que afeta as características de carcaça e composição química da carne em bovinos (PRADO et al., 2009a.; b). Sendo, por exemplo, o gado britânico conhecido por sua carne altamente marmorizada, enquanto raças zebuínas contém menos gordura e mais tecido conjuntivo (SILVA et al., 2002; MOREIRA et al., 2003).

Apesar da posição de destaque alcançada pelo país, problemas relacionados com a condição higiênico-sanitária da carne bovina podem representar um perigo à saúde pública, além de dificultar uma maior expansão neste segmento de mercado, devido à redução da vida útil decorrente de alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas dos produtos (BORGES; FREITAS, 2002).

2 MICROBIOLOGIA DA CARNE BOVINA

A microbiota inicial da carne irá influenciar diretamente na sua validade comercial, por meio da deterioração causada pelas bactérias, e no seu impacto na saúde pública, podendo estes microrganismos estarem relacionados com casos de infecções e intoxicações alimentares. A carne, devido ao seu elevado valor biológico e suas características intrínsecas, como composição química, elevada atividade de água e pH próximo à neutralidade, é um ótimo meio para a multiplicação de microrganismos, resultando em alterações indesejáveis e consequentemente na sua deterioração (SIGARINI, 2004; LAWRIE, 2005; FONTOURA et al., 2010).

O músculo de animais sadios é considerado estéril. A contaminação microbiana tanto por bactérias patogênicas como a própria microbiota deteriorante, pode acontecer no processo de abate e também por falhas de procedimentos operacionais para a produção da carne (SCHWACH, 2007). Dessa forma, alguns microrganismos podem ser originários do trato gastrointestinal, assim como do ambiente que o animal teve contato pouco tempo antes ou durante o abate (KOUTSOUMANIS; SOFOS, 2004).

A condição fisiológica do animal no pré-abate, a disseminação da contaminação durante o abate e processamento, a temperatura e as condições de armazenamento e distribuição estão intimamente relacionados com a qualidade microbiana da carne (NYCHAS et al., 2008). As fezes são consideradas as principais fontes de contaminação e podem atingir a carcaça por deposição direta, pela pele, ou por contato indireto com carcaças contaminadas, equipamentos, trabalhadores, instalações e ar (BORCH; ARINDER, 2002). Durante o processo de abate, a esfola e a evisceração representam etapas críticas, devido à possibilidade de contaminação cruzada entre a pele dos animais e a carcaça, assim como devido à possível ruptura do trato gastrointestinal. Dependendo do local da amostragem, a taxa de contaminação microbiana da pele pode variar de 10^4 a 10^9 UFC/cm² (SERRAINO et al., 2012).

Ao longo do processamento industrial, inúmeros fatores contribuem para o aumento e diversificação da microbiota contaminante. Devido ao número elevado de operações e a intensidade de manuseio, normalmente as carnes apresentam elevados números de contaminantes microbianos. Tais contaminantes são divididos entre microrganismos patogênicos e deteriorantes, já que a maioria dos deteriorantes não representa perigo à saúde pública, assim como a maioria dos patogênicos não são responsáveis pela deterioração microbiana (BLACKBURN, 2006).

A deterioração microbiana dos alimentos gera grandes prejuízos econômicos e pode resultar em um produto inaceitável para o consumo humano (GRAM et al., 2002). Pode ser caracterizada pelo aparecimento de limosidade, mudanças na textura ou desenvolvimento de odores indesejáveis causados por reações bioquímicas ou ações microbianas (JACKSON et al., 2001).

As mudanças sensoriais podem variar de acordo com o perfil microbiano contaminante da carne e com o armazenamento deste alimento. Essas alterações ocorrem pela utilização de nutrientes da carne como açúcares e aminoácidos livres resultando em compostos voláteis (ERCOLINI et al., 2006). Existem algumas bactérias que estão mais comumente envolvidas na deterioração deste produto, entre elas as psicrótróficas, *Acinetobacter* spp., *Psychrobacter* spp. (CERVENY et al., 2009).

Pseudomonas spp., Enterobacteriaceae, e as bactérias ácido-láticas (PENNACHIA et al., 2011).

A segurança e qualidade na carne *in natura*, podem ser estimadas pela contagem de microrganismos indicadores como aeróbios mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli* e microrganismos psicrotróficos (LOPES et al., 2007).

2.1 MICRORGANISMOS INDICADORES HIGIÊNICO-SANITÁRIOS

Segundo Franco e Landgraf (2008), microrganismos indicadores são grupos ou espécies que, quando presentes em um alimento, fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal ou sobre a deterioração potencial do alimento além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

Nos estabelecimentos de abate e processamento, bactérias indicadoras como mesófilos aeróbios, enterobactérias e *E. coli* são utilizadas durante o processo de verificação e validação do sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Embora suas correlações com a prevalência ou nível de patógenos não tenha sido comprovada, estas sugerem a possibilidade da ocorrência de patógenos, por demonstrarem a condição higiênica e contaminações de origem fecal (MILIOS et al., 2014; COMISSÃO EUROPEIA, 2007; USDA-FSIS, 1996). O monitoramento sistemático de microrganismos indicadores de higiene e patógenos garante informações fundamentais e uteis no controle da contaminação microbiológica de carcaças bovinas.

2.1.1 Bactérias mesófilas

As bactérias mesófilas são microrganismos que se multiplicam em temperaturas entre 20°C e 45°C, com temperatura ótima entre 30°C e 40°C (JAY, 2000). São constituídas de espécies da família Enterobacteriaceae, dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, dentre outros (SILVA et al., 2001). Este grupo fornece uma estimativa da população geral de microrganismos que estão presentes e altos níveis de contaminação estão associados à baixa qualidade microbiana (GILL et al., 1998).

Em superfícies de carcaças, a quantificação da população de microrganismos aeróbios mesófilos é comumente utilizada para fornecer dados que indiquem o grau de cuidados higiênico-sanitários durante as operações de abate, particularmente esfolagem e evisceração (ZWEIFEL; STEPHAN, 2003). Em carcaças recém abatidas é observada ocorrência de $<10^3$ UFC/cm² de bactérias mesófilas (ICMSF, 2011). De uma maneira

geral, contaminação de carnes em níveis acima de 10^6 UFC/cm² indica início de processo de deterioração, com produção de odores típicos e da validade comercial. Quando o nível de contaminação atinge valores da ordem de 10^7 UFC/cm² a formação de limosidade já é evidente (GILL, 1998).

Phillips et al. (2001) analisaram 1.275 amostras de carcaças bovinas em diferentes estabelecimentos e encontraram valores médios de $2,6 \times 10^2$ UFC/cm² para contagem total de mesófilos nas carcaças após refrigeração. Resultado semelhante foi reportado por Hansson (2001), que após análise de 200 carcaças bovinas, encontrou valores médios de mesófilos de $3,8 \times 10^2$ UFC/cm² e $2,7 \times 10^3$ UFC/cm².

Por não diferenciar os tipos de bactérias, a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos não é um indicador de segurança, pois não está diretamente relacionado à presença de patógenos ou toxinas, porém é utilizado para obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufaturas, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e validade comercial (SILVA et al., 2001). No entanto, deve-se considerar que todas as bactérias patogênicas de origem alimentar são mesófilas, e assim, uma alta contagem de mesófilos pode significar que houve condições para desenvolvimento de patógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.1.2 Bactérias psicrotróficas

As bactérias psicrotróficas são um grupo de extrema importância para a avaliação da qualidade e da perspectiva da validade comercial de carnes armazenadas e comercializadas sob refrigeração. A contagem total de aeróbios psicrotróficos é utilizada como indicador geral de populações bacterianas em alimentos refrigerados, já que são os microrganismos que crescem entre 0 e 7°C. Estão distribuídos em diversos gêneros como *Escherichia*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, podendo ser causadores de doenças (SILVA et al., 2010). Em um estudo avaliando as médias das populações de microrganismos psicrotróficos obtidas imediatamente após a lavagem das carcaças, Fontoura encontrou $6,4 \times 10$ UFC/cm², enquanto que para as amostras colhidas após refrigeração o valor foi de $1,6 \times 10^2$ UFC/cm² (FONTOURA, 2010).

O tipo e o número de bactérias psicrotróficas, o pH da carne, a temperatura de armazenamento e o tipo de embalagem irão influenciar diretamente a deterioração microbiana da carne (ICMSF, 2011). A deterioração da carne tem seu início quando a população de psicrotróficos está na faixa de 10^6 UFC/g, resultando em defeitos físicos como a descoloração da superfície; entre 10^7 e 10^8 UFC/g surgem odores estranhos e

em contagens por volta de 10^9 UFC/g aparece o limo superficial (ROÇA; SERRANO, 1995).

2.1.3 Bactérias da família Enterobacteriaceae

As enterobactérias sugerem contaminações causadas por fezes, por serem encontradas no intestino, mas também são encontradas em regiões extra intestinais. São bacilos Gram-negativos e estão amplamente distribuídos no solo, água, plantas e intestinos do homem e dos animais (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Fazem parte dessa família, os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* e *Yersinia* (KORNACKI; JOHNSON, 2001). A presença de enterobactérias é frequentemente usada como indicador para possível contaminação fecal decorrente de inadequado processamento ou contaminação pós-processamento (TORNADIJO et al., 2001), podendo refletir a higiene do abate. Esta família está diretamente relacionada com a saúde pública, possuindo como membros alguns sorotipos enteropatogênicos como é o caso dos gêneros *Escherichia* e *Salmonella*.

Os microrganismos desta família são mesófilos, mas há cepas psicrófilas principalmente dentro dos gêneros *Escherichia* e *Enterobacter*, e são indicadores úteis das condições de higiene dos processos de fabricação e contaminação pós-processamento, e indicadoras de possível contaminação entérica (JAY, 2005; SILVA et al., 2010). Também são importantes microrganismos deteriorantes, quando presentes em níveis de 10^7 UFC/cm² (GRAU, 1981).

Dentro da família Enterobacteriaceae, também está o grupo dos coliformes totais, ou coliformes a 35°C, representados pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, que apresentam a capacidade de fermentar lactose produzindo ácido e gás quando incubadas a 35-37°C (FRANCO; LANDGRAF, 2008). 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* e *Shigella*.

2.1.4 Bactérias ácido-láticas

As bactérias ácido-láticas são um grupo de microrganismos Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos e que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas. Os mais importantes gêneros são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* e se

classificam em homofermentativas e heterofermentativas (BRUNO; CARVALHO, 2009).

As homofermentativas produzem ácido láctico e heterofermentativas produzem além de ácido láctico, substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetil (BRUNO; CARVALHO, 2009). Crescem em diferentes temperaturas, altas concentrações de sal e são tolerantes a meios ácidos e alcalinos (SALMINEN; VON WRIGHT, 1993). Apenas poucas bactérias ácido-láticas, tais como os enterococos, são envolvidas em casos de infecção de origem alimentar (DELAVENNE et al., 2012).

Porém deve-se considerar que altas contagens de bactérias ácido-láticas podem ser problemáticas, podendo resultar em formação de sabor indesejável em alguns alimentos (HAYES; BOOR, 2001). Em carnes refrigeradas embaladas à vácuo a condição de microaerofilia e aumento de CO₂ promove o aumento da população de bactérias psicrotróficas Gram positivas, como as bactérias ácido-láticas, no lugar das bactérias psicrotróficas Gram negativas (predominantemente *Pseudomonas*). Consequentemente, a fermentação das bactérias ácido-láticas pode provocar odores ácidos, além da produção de gás e limosidade, com alterações na coloração do produto (BLACKBURN, 2006).

2.1.5 *Escherichia coli* patogênicas

Escherichia coli pertence à família Enterobacteriaceae e é um componente normal da microbiota intestinal dos animais de sangue quente, incluindo o homem (ACHA; SZYFRES, 2003). Se caracteriza por ser um bacilo Gram negativo, não esporulado e capaz de fermentar glicose com produção de ácido e gás (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A contagem alta de *E. coli* pode indicar falhas nas condições higiênicas durante o abate e processamento, como também armazenamento em alta temperatura (>7-8°C), sendo que <10 UFC/g da carne pode ser geralmente encontrado nos processos de abate (ICMSF, 2011).

As cepas comensais de *E. coli* raramente causam doença, exceto em animais imunologicamente comprometidos ou quando a barreira gastrointestinal normal é quebrada (MENG et al., 2007). Existem diversas linhagens comprovadamente patogênicas para o homem e animais e sua presença nos alimentos indica uma possível contaminação de origem fecal, assim como eventual ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). As cepas patogênicas são divididas em diferentes grupos considerando suas propriedades virulentas, síndromes clínicas, epidemiologia e diferentes sorogrupos (JAY, 2005). A sua classificação pode ser realizada sorologicamente, por meio dos antígenos “O” dos lipopolissacarídeos (LPS)

de parede e dos antígenos “H” do flagelo bacteriano (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; GYLES, 2007). Assim como, de acordo com a patogenicidade e os sintomas clínicos, os quais estão diretamente relacionados aos fatores de virulência expressos (CDC-HHS, 2015).

Segundo o “Centers for Disease Control and Prevention - CDC/HHS/USA” (CDC-HHS, 2015), seis patotipos estão relacionados à diarreia e são coletivamente referidos como *E. coli* Diarreiogênicas (DEC): *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), sendo esta a mais frequente nas infecções em humanos veiculadas por alimentos; *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* Enteropatogênica (EPEC); *E. coli* Enteroagregativa (EAEC, ou EAggEC); *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC); e *E. coli* Aderente Difusa (DAEC).

Nos últimos anos *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), emergiu como o maior risco associado às carnes vermelhas, tanto em aspectos de saúde pública, como em barreiras técnicas, comerciais e devoluções de mercadorias (DUFFY et al., 2014; EFSA, 2013a, 2013b). Animais ruminantes, especialmente os bovinos, são os principais reservatórios naturais dos patotipos STEC e EPEC e estão epidemiologicamente relacionados à maioria dos surtos e mortes de humanos por estes grupos de patógenos (BAKER et al., 2016; BUNCIC et al., 2014; CROSSLAND et al., 2015; DUFFY et al., 2014).

A *E. coli* STEC é definida pela produção de pelo menos um tipo de “Shiga toxin (Stx)”, sendo que os dois principais tipos são “Shiga toxin 1 (Stx1)” e “Shiga toxin 2 (Stx2)” (GYLES, 2007). Esta toxina na corrente circulatória pode resultar em hemólise, lesão endotelial, oclusão vascular e nefrite (KAPER et al., 2004), além da Síndrome Urêmica Hemolítica – SHU, caracterizada por insuficiência renal aguda, que acomete principalmente crianças menores de cinco anos, idosos e imunocomprometidos (FULLER et al., 2011; GOMES et al., 2016; HE et al., 2012; KARMAI et al., 2010), assim como, da Trombocitopenia Trombótica Púrpura (TTP) em adultos (PAULA et al., 2014).

As *E. coli* STEC que apresentam associação com o gene *eae* são conhecidas como STEC *eae*+, antiga *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), e apresentam cepas com alta virulência para os seres humanos, como *E. coli* O157:H7, que foi a primeira cepa STEC reconhecida como uma ameaça à saúde pública (HE et al., 2012; KARMAI et al., 2010; RILEY et al., 1983). Este sorotipo é o mais isolado de surtos em humanos nos Estados Unidos, Canadá e Argentina, principalmente dos casos com a necessidade de hospitalização (CRIM et al., 2014; GOULD et al., 2013; TARR et al., 2005). Em outros países, como Austrália, Alemanha e Áustria, outros sorotipos,

conhecidos por STEC “non-O157”, se destacam nos surtos em humanos (TARR et al., 2005).

Em 2012, os seis sorotipos mais frequentes, conhecidos como “top six non-O157 STEC” (O26, O45, O103, O111, O121 e O145), foram declarados pelo governo dos Estados Unidos, junto com o sorotipo O157, como adulterantes da carne bovina (USDA-FSIS, 2012). No Brasil, o Programa Nacional de Controle de Patógenos (PNCP) determinou que os estabelecimentos sob fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF), especializados no abate e/ou na desossa de bovinos, realizem o monitoramento de *E. coli* O157:H7 e de seis sorotipos não-O157 STEC (O26, O45, O103, O111, O121 e O145) na carne bovina in natura (BRASIL, 2015).

Embora a incidência de SHU no Brasil seja baixa e somente dois casos de *E. coli* O157:H7 tenham sido descritos, sorotipos importantes como O26, O103, O111 e O145 têm sido isolados de pacientes, assim como alguns sorotipos incomuns (O1, O24 e O77). Além disso, altas prevalências de STEC têm sido verificadas nas fezes de animais, como ovinos, bovinos e suínos, inclusive para os sorotipos O157:H7 e O103:H2, que estão frequentemente relacionados aos surtos em humanos (GOMES et al., 2016) e podem representar um grande risco para a cadeia produtora da carne.

3 ÁCIDO LÁTICO

Apesar da intensificação dos procedimentos de Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos, o uso de intervenções específicas pode contribuir com a redução ou eliminação de bactérias patogênicas ou de microrganismos deteriorantes de carnes (BUNCIC; SOFOS, 2012). A utilização de agentes químicos na sanitização de carcaças de animais recém-abatidos tem sido intensivamente estudada, na busca de reduzir a presença de microrganismos patogênicos. Alguns destes agentes de sanitização são os ácidos orgânicos, os quais podem ser empregados para diminuir a contaminação microbiana (DREHMER, 2005).

Sobre o mecanismo de ação dos ácidos orgânicos, há diferentes suposições. Russel (1992) explicou que a forma não dissociada do ácido seria lipossolúvel e nessa forma teria capacidade de atravessar de forma passiva a membrana celular. No interior da célula, o ácido se dissociaria alterando o pH citoplasmático, modificando o gradiente de prótons e a carga elétrica com o exterior celular. Isso interferiria no sistema de transporte de aminoácidos e fosfatos além de inativar enzimas. Outra consequência seria o aumento da pressão osmótica celular devido aos mecanismos de compensação de carga elétrica, aumentando os níveis de sódio, potássio ou glutamato e a força iônica intracelular, provocando um aumento da pressão mecânica sobre a parede do microrganismo, o que faria com que essa se rompesse.

Lues e Theron (2011) descreveram que a atividade bactericida dos ácidos orgânicos ocorre devido às suas formas não dissociadas, as quais têm como alvo as funções metabólicas dos micro-organismos, tais como a produção de proteína, a inibição de ATP e um aumento na pressão osmótica.

Silva (1998) enfatizou que a atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos depende da redução do pH, da mínima dissociação do ácido e da toxicidade da molécula. Os ácidos fracos são mais eficientes do que os ácidos fortes, visto que os ácidos fracos são capazes de acidificar o interior da célula.

Entre os ácidos orgânicos, o ácido láctico é o mais utilizado nos abates comerciais (BOSILEVAC et al., 2008). Ele tem ação lipofílica, promovendo a entrada de íons hidrogênio na membrana celular do microrganismo, o que acidifica o seu interior e ocasiona o desequilíbrio homeostático, inibindo reações metabólicas essenciais e promovendo o acúmulo de substâncias tóxicas (DAVIDSON; TAYLOR, 2007). Exerce tanto efeito bactericida, imediatamente após sua aplicação, como efeito bacteriostático, de ação prolongada (PRASAI et al., 1992).

3.1 ÁCIDO LÁCTICO NA DESCONTAMINAÇÃO DE CARCAÇAS BOVINAS

A aspersão do ácido láctico é um procedimento amplamente disseminado e regulamentado em países como Estados Unidos (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2014), onde é considerado uma das intervenções mais comuns para descontaminação de carne bovina *in natura* (FOULADKHAH et al., 2013) e no continente Europeu (UNIÃO EUROPEIA, 2013), sendo permitido o uso em concentrações entre 2 a 5%, com a solução em temperatura de até 55°C.

A sua eficácia tem sido relatada por grande quantidade de estudos (CUTTER; RIVERA-BETANCOURT, 2000; ARTHUR et al., 2004; HARRIS et al., 2006; ARTHUR et al., 2008) e a descontaminação microbiana é aumentada por concentrações de ácido láctico superiores a 2% na solução aplicada (STOPFORTH et al., 2005). O efeito redutor da contaminação foi observado até mesmo em carcaças bovinas já resfriadas, sendo utilizado em concentração de 4%, a temperatura de solução de 55° C, aplicado por 30 segundos, numa quantidade de 500 ml por meia carcaça (CASTILLO et al., 2001).

Pittman et al. (2012) avaliaram a aspersão de concentrações de ácido láctico (2% ou 5%) em carcaças bovinas, em uma única aplicação e outra posterior, com intervalo de 24 horas e encontraram redução na viabilidade de *E. coli* O157: H7 e de 12 cepas de *E. coli* STEC não-O157 de *E. coli* de 1,6 e 2,5 log UFC/cm², quando utilizado como um único tratamento, e de 2,4 a 3,4 log UFC/cm² após o segundo

tratamento, independentemente da concentração utilizada. Ainda avaliando o efeito em *E. coli*, Youssef, Bandoni e Gil (2012) relataram que dependendo do tipo de tecido tratado (adiposo, membranoso ou muscular) a redução pode variar.

Em condições de contaminação natural da carcaça, já foram reportados efeitos sobre bactérias mesófilas (CASTILLO et al., 2001; BARBOZA de MARTINEZ et al., 2002; GILL; BADONI, 2004; BOSILEVAC et al., 2008), coliformes (CASTILLO et al., 2001; BARBOZA de MARTINEZ et al., 2002), Enterobacteriaceae (BOSILEVAC et al., 2008) e *E. coli* (CASTILLO et al., 2001; BARBOZA de MARTINEZ et al., 2002). Em um estudo avaliando a aspersão de 2% de ácido láctico em carcaças foi observada a redução no número de bactérias mesófilas, psicrotróficas, coliformes, *E. coli* e bactérias ácido-láticas, logo após o tratamento, e que se manteve após 24 horas de resfriamento (DORMEDY et al., 2000). Em um relatório da Comissão Europeia (EFSA, 2011), o ácido láctico reduziu entre -0,1 e 3,7 log UFC as contagens referentes à contaminação natural de Enterobacteriaceae em carcaças de bovinas pré-resfriadas e entre -0,2 e 5,8 log UFC em carcaças após o resfriamento.

Porém, alguns estudos demonstram que as soluções de ácido láctico podem ter efeitos reduzidos na descontaminação de carcaças ou cortes na prática comercial (BACON et al., 2002; GILL; LANDERS, 2003). A eficiência da aspersão do ácido láctico está diretamente relacionada com fatores como a concentração, o tipo de tecido a ser tratado, o volume de solução e o grau de contaminação inicial (YOUSSEF et al., 2012), o que poderia explicar tais resultados e ressalta a importância de se avaliar cada sistema de produção e condições de abate. Silva (1998) também relatou que o efeito do tratamento com ácidos orgânicos depende da concentração do ácido, do tempo de aplicação, da temperatura e do método de aplicação.

3.2 ÁCIDO LÁCTICO E A COR DA CARNE BOVINA

Tão importante quanto seus efeitos na redução microbiana, as implicações nas características sensoriais da carne e da carcaça devem ser consideradas no uso de procedimentos de descontaminação. A cor da carne é o primeiro critério utilizado pelo consumidor no momento da compra (Muchenje et al. 2009). Apesar deste atributo não afetar a palatabilidade, é um aspecto importante na comercialização, visto que carnes com coloração mais escura sofrem maior rejeição por parte dos consumidores.

Os principais pigmentos responsáveis pela cor característica da carne são a mioglobina e a hemoglobina, formadas em sua maior parte por proteínas. A mioglobina é o pigmento muscular que retém o oxigênio nos tecidos e hemoglobina é o pigmento sanguíneo responsável pelo transporte de O₂ na corrente sanguínea. A molécula da mioglobina consiste em uma fração proteica, a globina, e um grupo heme, que tem um

átomo de ferro localizado na porção central. Este pode formar seis ligações, sendo que o ligante presente na sexta ligação e a valência do íon ferro resultam na cor da carne (MANCINI; HUNT, 2005).

Na ausência de oxigênio, predomina deoximioglobina, forma reduzida do pigmento (Fe^{++}), de coloração vermelho-púrpura. Quando a deoximioglobina é exposta ao oxigênio, este se liga ao ferro e ocorre oxigenação, responsável pela cor vermelha brilhante (oximioglobina). A oxidação do íon ferroso (Fe^{++}) para a forma férrica (Fe^{+++}), em baixas concentrações de oxigênio, resulta na formação de metamioglobina, marrom (MANCINI; HUNT, 2005).

Conhecer os mecanismos de estabelecimento da cor da carne e como ele pode ser afetado é essencial nos estudos considerando a carne bovina, incluindo aqueles relacionados com a melhoria da qualidade microbiana das carcaças. As informações sobre o efeito do ácido láctico nas características sensoriais são limitadas e controversas (JIMÉNEZ-VILLARREAL, et al. 2003; QUILO, et al., 2010).

Altas concentrações de solução de ácido láctico resultam em descoloração da carne e aparecimento de coloração marrom na gordura, conforme verificado por Smulders et al. (1986).

Ellebracht et al. (1999), ao utilizarem recortes de carne submetidos a tratamento com água quente, seguido por aplicação de 2% de ácido láctico, observaram que as superfícies das amostras se tornaram mais escuras. Porém, a carne moída proveniente destes recortes, não teve diferenças para os valores de L^* , a^* , b^* . Portanto, os autores relataram que a mudança da coloração da carne foi temporária, e não foi suficiente para alterar as características do produto final.

Stivarius et al. (2002), ao utilizarem recortes de carne bovina tratados por três minutos com água quente (82°C), ácido láctico a 5% ou um controle não tratado, encontraram que o tratamento com ácido láctico apresentava cor mais clara e menor teor de oximioglobina, quando comparado aos demais tratamentos.

Já em um estudo de Jimenez-Villareal et al. (2003), a carne moída bovina tratada com solução de ácido láctico 2% manteve características sensoriais de cor e odor semelhantes à carne sem tratamento.

Semler et al. (2013), utilizando cortes de *Psoas major* e *Gluteus medius* inoculados com *E. coli* genérica e tratados com 4,17% de ácido láctico, apesar de encontrarem diminuição significativa na contagem bacteriana, observaram redução no valor do parâmetro L^* e do parâmetro a^* , para os dois cortes avaliados, além de aumento no valor de b^* para o *Gluteus medius*.

Recentemente, um estudo avaliou a aspersão de diferentes concentrações de ácido láctico (2, 3, 4 e 5%) em cortes de carne da região do pescoço, e seus efeitos na

redução microbiana e na avaliação da cor da carne, tanto por avaliação instrumental (sistema CIELAB), quanto análise sensorial por avaliadores treinados e escala hedônica. Comparando todos os tratamentos juntos com o controle, a luminosidade aumentou ($L^* = 36.52 \pm 4.47$ vs 30.98 ± 5.37), o vermelho diminuiu ($a^* = 12.12 \pm 2.84$ vs 7.75 ± 3.01 ; $P < 0.01$) e o amarelo aumentou ($b^* = 12.87 \pm 2.88$ vs 6.51 ± 4.13). Os avaliadores consideraram a aspersão de 5% prejudicial para cor, odor e aparência da carne, sendo que a aspersão de 2 a 4% não afetou a aceitabilidade (RODRÍGUEZ-MELCÓN, 2017).

4 OBJETIVOS

Apesar das inúmeras comprovações do efeito do ácido láctico na redução da contaminação de carcaças bovinas, não são relatados estudos considerando carcaças provenientes de *Bos indicus*, que compõem 80% do rebanho nacional, sendo que aqueles com características da raça Nelore representem quase a totalidade desses (FERRAZ; FELÍCIO, 2010). Além da espécie, a realidade nacional do sistema de criação destes animais e do manejo alimentar é muito diferente daquelas praticadas nos países onde se concentra a grande maioria das pesquisas no assunto, que também possuem tecnologia de abate diferente.

Perante estes aspectos, o objetivo geral do presente trabalho foi determinar um protocolo de descontaminação de carcaças *B. indicus* utilizando aspersão de diferentes soluções de ácido láctico.

Objetivos específicos:

- Determinar a eficácia na redução microbiana de carcaças *B. indicus*, pelo uso da aspersão de diferentes concentrações de ácido láctico.
- Determinar o efeito da temperatura de solução de ácido láctico sobre a redução microbiana.
- Avaliar se o processo de resfriamento das carcaças bovinas em câmara fria pode interferir na ação da solução de ácido láctico.
- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de soluções de ácido láctico sobre a cor instrumental de carcaças.

A presente pesquisa resultará no artigo intitulado “AVALIAÇÃO MICROBIANA E COR DE CARCAÇAS DE BOVINOS (*Bos indicus*) ASPERGIDAS COM DIFERENTES SOLUÇÕES DE ÁCIDO LÁCTICO”, o qual será submetido à revista Meat Science conforme as suas regras de publicação.

5 REFERÊNCIAS

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Perfil da Pecuária no Brasil – Relatório Anual 2016**, 2016. Disponível em: <<http://abiec.siteoficial.ws/images/upload/sumario-pt-010217.pdf>>. Acesso em: 23/05/2017.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses and communicable diseases common to man and animals**. 3.ed. Washington, DC: Pan American Health Organization, v.1, 2003.

ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; NOU, X.; et al. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, Enterobacteriaceae, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. **Journal of Food Protection**, v.67, n.4, p.658-665, 2004.

ARTHUR, T.M.; KALCHAYANAND, N.; BOSILEVAC, J.M.; et al. Comparison of effects of antimicrobial interventions on multidrug-resistant *Salmonella*, susceptible *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v.71, n.11, p. 2168-2181, 2008.

BACON, R.T.; SOFOS, J.M.; BELK, K.E.; et al. Commercial application of lactic acid to reduce bacterial population on chilled beef carcasses, subprimal cuts and table surfaces during fabrication. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.22, p.674-682, 2002.

BAKER, C.A.; RUBINELLI, P.M.; PARK, S.H.; et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. **Food Control**, v.59, p.407-419, 2016.

BARBOZA DE MARTINEZ, Y.; FERRER, K.; SALAS, E.M. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 4, n.11, p.1687–1829, 2002.

BLACKBURN, C.W. (editor). *Food Spoilage Microorganisms*. CRC Press LLC, Boca Raton, USA, 736p., 2006.

BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. **Meat Science**, v.62, n.3, p.381-390, 2002.

BORGES, J.T.S; FREITAS, A.S. Aplicação do sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. **Boletim de Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 20, n.1, p.1-18, 2002.

BOSILEVAC, J.M.; NOU, X.; BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; et al. Treatments Using Hot Water Instead of Lactic Acid Reduce Levels of Aerobic Bacteria and Enterobacteriaceae and Reduce the Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on Preevisceration Beef Carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 69, n.8, p.1808–1813, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Norma Interna DIPOA/SDA nº 1, de 17 de junho de 2015. Aprovar os procedimentos para a

coleta e análise de *Escherichia coli* verotoxigênica e *Salmonella* spp. em carne de bovino *in natura* utilizada na formulação de produtos cárneos, cominutados, prontos para serem cozidos, fritos ou assados. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 2015.

BRUNO, L.M.; CARVALHO, D.G. Documentos 124: **Microbiota Lática de Queijos Artesanais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical Fortaleza, 26p, 2009.

BUNCIC, S.; NYCHAS, G.; LEE, M.R.F.; et al. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. **Meat Science**, v.97, p.288-297, 2014.

BUNCIC, S.; SOFOS, J. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p.641655, 2012.

CASTILLO, A.; LUCIA, L.M.; ROBERTSON, D.B.; et al. Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef. **Journal of Food Protection**, v.64, n.1, p.58-62, 2001.

CDC-HHS. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). U.S. Department of Health & Human Services (HHS). **E.coli Homepage. General Information**. Page last updated: November 6, 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

CERVENY, J.; MEYER, J.D.; HALL, P.A. Microbiological spoilage of meat and poultry products In: **Compendium of the microbiological spoilage, of foods and beverages. Food Microbiology and Food Safety**, SPERBER, W.H.; DOYLE, M.P. New York: Springer Science & Business Media, p.69-868, 2009.

COMISSÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) nº 1441/2007 do Conselho de 05 de dezembro de 2007. Altera o Regulamento (CE) nº 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, p.L322/12-L322/29, 05 dez. 2007.

CRIM, S.; IWAMOTO, M.; HUANG, J.; et al. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food- Foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 2006-2013. **Centers for Disease Control and Prevention MMWR**, v. 63, n.15, p.328-332, 2014.

CROSSLAND, W.L.; CALLAWAY, T.R.; TEDESCHI, L.O. Shiga toxin-producing *E. coli* and ruminant diets: A match made in heaven? In: **Food Safety: Emerging Issues, Technologies and Systems**, p.185-214, 2015.

CUTTER, C.N.; RIBERA-BETANCOURT, M. Interventions for the reduction of *Salmonella Typhimurium* DT 104 and non-O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* on beef surfaces. **Journal of Food Protection**, v.63, n.10, p.1326-1332, 2000.

DAVIDSON, P.M.; TAYLOR, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT L.R. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 3 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.713-745, 2007.

DAVIES, M.; HADLEY, P.; STOSIC, P.; et al. Production factors that influence the hygienic condition of finished beef cattle. **The Veterinary Record**, v.146, n.7, p.179–183, 2000.

DELAVEENNE, E.; MOUNIER, J.; DENIEL, F.; et al. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one year period. **International Journal of Food Microbiology**, v.155, p.185-190, 2012.

DORMEDY, E., BRASHEARS, M., CUTTER, N., Y BURSON, E. Validation of acid washes as critical control points in hazard analysis and critical control points systems. **Journal of food protection**, v.63, n.12, p.1676-1680, 2000.

DREHMER, A.M.F. **Quebra de peso das carcaças suínas e estudo da vida de prateleira da carne**. 2005, 131p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria - Santa Maria – RS, 2005.

DUFFY, G.; BURGESS, C.M.; BOLTON, D.J. A review of factors that effect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain. **Meat Science**, v.97, p.375-383, 2014.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. **EFSA Journal**, v.9, n.7, p.2317-2351, 2011.

EFSA. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA Journal** 2013, v.11, n.4, 250p, 2013a.

EFSA. European Food Safety Authority. Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (bovine animals). **EFSA Journal** 2013, v.11, n.6, 261p, 2013b.

ELLEBRACHT, E.A.; CASTILLO, A.; LICUA, L.M.; MILLER, R.K.; ACUFF, G.T. Reduction of Pathogens Using Hot Water and Lactic Acid on Beef Trimmings. **Journal of Food Science**, v.64, n.6, p.1094-1099, 1999.

ERCOLINI, D.; LA STORIA, A.; VILLANI, F.; et al. Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable staining and epifluorescence microscopy. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.765-772, 2006.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. FSIS DIRECTIVE – Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products, 7120.1 Rev.21, de 9 de Outubro de 2014. **United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service**, Washington D.C., 69p, 2014.

FERRAZ, J.B.S.; FELÍCIO, P.E. Production systems—An example from Brazil. **Meat science**, v.84, n.2, p.238-243, 2010.

FONTOURA, C.L.; ROSSI JUNIOR, O.D. MARTINELLI, T.M.; et al. Estudo microbiológico em carcaças bovinas e influência da refrigeração sobre a microbiota contaminante. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.2, p.189-193, 2010.

FOULADKHAH, A.; GEORNARAS, I.; YANG, H.; et al. Lactic acid resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Newport* in meat homogenate. **Food Microbiology**, v.36, n.2, p.260-266, 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, p.93-98, 2008.

FULLER, C.A.; PELLINO, C.A.; FLAGLER, M.J.; et al. Shiga toxin subtypes display dramatic differences in potency. **Infection and immunity**, v.79, n.3, p.1329-1337, 2011.

GILL, C.O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. (Eds.) **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic & Professional, p.118-157, 1998.

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

GILL, C.O.; LANDERS, C. Microbiological effects of carcass decontaminating treatments at four beef packing plants. **Meat Science**, v.65, n.3, p.1005-1011, 2003.

GOMES, T.A.; ELIAS, W.P.; SCALETISKY, I.C.; et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, p.3-30, 2016.

GOULD, L.H.; MODY, R.K.; ONG, K.L.; et al. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, p.453-460, 2013.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; et al. Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, n.1-2, p.79–97, 2002.

GRAU, F.H. Role of pH, lactate, and anaerobiosis in controlling the growth of some fermentative Gram-negative bacteria on beef, **Applied and Environmental Microbiology**, v.42, p.1043- 50, 1981.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing: An overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, n.13, p. E45-E62, 2007.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. *Escherichia coli*. In: Eds C.L.; GYLES, J.F.; PRESCOTT, J.G.; SINGER, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. Blackwell Publishing, p.267-308, 2010.

HANSSON, I.B. Microbiological meat quality in high- and low-capacity slaughterhouses in Sweden. **Journal of Food Protection**, v.64, n.6, p.820-825, 2001.

HARRIS, K.; MILLER, M.F.; LONERAGAN, G.H.; et al. Validation of the use of organic acids and acidified sodium chlorite to reduce *Escherichia coli* O157 and *Salmonella Typhimurium* in beef trim and ground beef in a simulated processing environment. **Journal of Food Protection**, v.69, n.8, p.1802-1807, 2006.

HAYES, M.C.; BOOR, K. Raw milk and fluid milk products. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. (Eds.). **Applied dairy microbiology**, 2 ed. New York: Marcel Dekker, p.59-76, 2001.

HE, X.; QUIÑONES, B.; MCMAHON, S.; et al. A single-step purification and molecular characterization of functional Shiga toxin 2 variants from pathogenic *Escherichia coli*. **Toxins**, v.4, n.7, p.487-504, 2012.

ICMSF- INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOOD **Microrganisms in Food. 8** – Use of data for assessing process control and product acceptance. New York: Springer, 400p, 2011.

JACKSON, T.C.; ACUFF, G.R.; DICKSON, J.S. Meat, poultry, and seafood. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington, D.C.: ASM Press, p.83–100, 2001.

JAY, J.M. Indicators of food microbiological quality and safety. **Modern food microbiology**. 6.ed. Maryland: Aspen Publication, p.387-407, 2000.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**, 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 771p, 2005.

JIMÉNEZ-VILLAREAL, J.R.; POHLMAN, F.W.; JOHNSON, Z.B., et al. Effects of chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride, lactic acid and trisodium phosphate on physical, chemical and sensory properties of ground beef. **Meat Science**, v.65, n.3, p.1055-1062, 2003.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.123-140, 2004.

KARMALI, M.A.; GANNON, V.; SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary microbiology**, v.140, n.3, p.360-370, 2010.

KORNACKI J.L.; JOHNSON J.L. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington DC: American Public Health Association, v.8, p.69-82, 2001.

KOUTSOUMANIS, K,P.; SOFOS, J.N. Microbial contamination of carcasses and cuts. In: Jensens, W.K. (Ed.), **Encyclopedia of Meat Sciences**, Amsterdam: Elsevier Academic Press, p.727–737, 2004.

LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. Trad. Jane Maria Rubensam. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 384p., 2005.

LOPES, M.; GALHARDO, J.A.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; MULLER, E.E. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré- resfriamento em abatedouro de aves. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, p.465-476, 2007.

LUES, J.F.; THERON, M.M. Comparing organic acids and salt derivatives as antimicrobials against selected poultry-borne *Listeria monocytogenes* strains in vitro. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.9, n.12, p.1126-1129, 2011.

MANCINI, R.A.; HUNTI, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, v.71, n.1, p.100-121, 2005.

MENG, J. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 3. ed. Washington, DC: ASM, 2007.

MILIOS, K.T.; DROSINOS, E.H.; ZOIPOPOULOS, P.E. Food Safety Management System validation and verification in meat industry: Carcass sampling methods for microbiological hygiene criteria – A review. **Food Control**, v.43, p.74-81, 2014.

MOREIRA, F.B.; SOUZA, N.E.; MASTUSHITA, M.; et al. Evaluation of carcass characteristics and meat chemical composition of Bos indicus×Bos Taurus crossbred steers finished in pasture systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.4, p.609-616, 2003.

MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; CHIMONYO, M.; STRYDOM, P.Q.; RAATS, J.G. Relationship between pre-slaughter stress responsiveness and beef quality in three cattle breeds. **Meat Science**, v.81, n.4, p.653-657, 2009.

NYCHAS, G.E.; SKANDAMIS P.N.; TASSOU, C.C.; et al. Meat spoilage during distribution. **Meat Science**, v.78, p.77–89, 2008.

PAULA, C.M.D.; CASARIN, L.S.; TONDO, E.C. *Escherichia coli* O157: H7 - patógeno alimentar emergente. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v.2, n.4, p.23-33, 2014.

PHILLIPS, D.; SUMNER, J.; ALEXANDER, J.F.; et al. Microbiological quality of Australian beef. **Journal of Food Protection**, v.64, n.5, p.692-696, 2001.

PITTMAN, C.I.; GEORNARAS, I.; WORENER, D.R.; et al. Evaluation of lactic acid as an initial and secondary subprimal intervention for *Escherichia coli* O157:H7, non-O157 shiga toxineproducing *E. coli*, and a nonpathogenic *E. coli* surrogate for *E. coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v.75, n.9, p.1701-1708, 2012.

PRADO, R.M.; PRADO, I.N.; MARQUES, J.A.; et al. Meat quality of the *Longissimus muscle* of bulls and steers (1/2 Nellore vs. 1/2 Simmental) finished in feedlot. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.18, p.221-230, 2009a.

PRADO, I.N.; OLIVEIRA, A.N.; ROTTA, P.P.; et al. Chemical and fatty acid composition of *Longissimus muscle* of crossbred bulls finished in feedlot. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.22, n.7, p.1054-1059, 2009b.

PRASAI, R.K.; ACUFF, G.R.; LUCIA, L.M.; et al. Microbiological effects of acid decontamination of pork carcasses at various locations in processing. **Meat Science**, v.32, n.4, p.413-423, 1992.

QUILO, S.A.; POHLMAN, F.W.; DIAS-MORSE, P.N.; et al. Microbial, instrumental colour and sensory characteristics of inoculated ground beef produced using potassium lactate, sodium metasilicate or peroxyacetic acid as multiple antimicrobial interventions. **Meat Science**, v.8, n.3, p.470-476, 2010.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; et al. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. **The New England Journal of Medicine**, v.308, p.681-685, 1983.

ROÇA, R.O.; SERRANO, M.A. **Abate de bovinos: alterações microbianas da carcaça. Higiene Alimentar**, v.9, n.35, p.8-12, 1995.

RODRÍGUEZ-MELCÓN, C.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R. Lactic acid concentrations that reduce microbial load yet minimally impact colour and sensory characteristics of beef. **Meat Science**. v.129, p.169–175, 2017.

RUSSELL, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, n.5, p.363-370, 1992.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. (Ed). **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1993.

SCHWACH, E. **Validação do sistema de monitoramento para redução da contaminação microbiana em carcaças bovinas**. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

SEMLER, M.E.; CHAO, M.D.; HOSCH, J.; et al. Color and sensory properties of beef steaks treated with antimicrobial sprays. **Nebraska Beef Cattle Reports**, Paper 750, p.110-111, 2013. Disponível em: <http://digitalcommons.unl.edu/animalsinbcr/750>. Acesso em: 20 fev. 2015.

SERRAINO, A.; BARDASI, L.; RIU, R.; et al. Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. **Meat Science**, v.90, n.2, p.502-506, 2012.

SIGARINI, C.O. **Avaliação microbiológica da carne bovina desossada em estabelecimentos comerciais do município de Cuiabá-MT/Brasil**. Dissertação. Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal. Universidade Federal Fluminense, 95p., 2004.

SILVA, M. R.; SACANAVACCA, J.; GANDRA, T.K.V. et al. Avaliação higiênico-sanitária do leite produzido em Umuarama (Paraná). **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 28; n.2; p. 271- 280, 2010.

SILVA, J.A. Micro-organismos patogênicos em carne de frango. **Revista Higiene Alimentar**, v.12, n.58, p.9-14,1998.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SILVA, R.G.; PRADO, I.N.; MAKORO, M.; et al. Dietary effects on muscle fatty acid composition of finished heifers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.95-10, 2002.

SMULDERS, F. J. M.; BARENDSEN, P.; van LOGTESTIJN, J. G.; MOSSEL, D. A. A.; VAN DER MAREL, G. M. Review: Lactic acid—considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant. **J. Food Technol**, v. 21, p.419–436, 1986.

STIVARIOUS, M.R.; POHLMAN, F.W.; MCELYEA, K.S.; et al. Effects of hot water and lactic acid treatment of beef trimmings prior to grinding on microbial, instrumental colour and sensory properties of ground beef during display. **Meat Science**, v.60, n.4, p.327-334, 2002.

STOPFORTH, J.D.; ASHTON, L.V.; SKANDAMIS, P.N.; et al. Single and sequential treatment of beef tissue with lactic acid, ammonium hydroxide, sodium metasilicate,

and acidic and basic oxidized water to reduce numbers of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium*. **Food Protection Trends**, v.25, p.14-22, 2005.

TARR, P.I.; GORDON, C.A.; CHANDLER, W.L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **The Lancet**, v.365, p.1073-1086, 2005.

TORNADIJO, M.E.; GARCÍA, M.C.; FRESNO, J.M.; et al. Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simón cheese. **Food Microbiology**, v.18, n.5, p.499–509, 2001.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) N° 101/2013 da Comissão, de 4 de fevereiro de 2013. Relativo à utilização do ácido láctico para reduzir a contaminação superficial microbiológica das carcaças de bovinos. **Jornal Oficial da União Européia**, p. L34/1-L34/2, 5 de fev. de 2013.

USDA-FSIS. U.S. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. **Federal Register**, Washington, DC, v.144, n.61, p.388-405, 1996.

USDA-FSIS. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Office of Policy and Program Development. Office of Public Health Science: **Risk profile for pathogenic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (non-O157 STEC) – May 2012**. Disponível em < http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/92de038d-c30e-4037-85a6-065c3a709435/Non_O157_STEC_Risk_Profile_May_2012.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 06 jun. 2014.

YOUSSEF, M.K.; YANG, X.; BADONI, M.; et al. Effects of spray volume, type of surface tissue and inoculum level on the survival of *Escherichia coli* on beef sprayed with 5% lactic acid. **Food Control**, v.25, n.2, p.717-722, 2012.

ZWEIFEL, C; STEPHAN, R. Microbiological Monitoring of Sheep Carcass Contamination in Three Swiss Abattoirs. **Journal of Food Protection**: June 2003, v.66, n.6, p. 946-952, 2003.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO MICROBIANA E COR DE CARÇAÇAS DE BOVINOS (*Bos indicus*) ASPERGIDAS COM DIFERENTES SOLUÇÕES DE ÁCIDO LÁTICO

RESUMO

A contaminação de carcaças bovinas pode veicular patógenos e afetar a inocuidade alimentar, o que eleva o risco de doenças ao consumidor, além de reduzir a validade comercial da carne e acarretar em prejuízos econômicos para a indústria. Neste sentido, ácido láctico tem sido utilizado na redução da contaminação microbiana inicial de carcaças nos Estados Unidos e na Europa, entretanto existe carência de estudos considerando a realidade da pecuária e da tecnologia de abate brasileira. O objetivo do presente trabalho foi determinar a eficácia da aspersão de diferentes concentrações de ácido láctico como intervenção antimicrobiana em carcaças *Bos indicus*, pelo uso, sobre a carga microbiana e sua influência na cor da carcaça. Para isso, o estudo foi dividido em duas fases. O estudo 01 foi realizado com 132 meias carcaças *Bos indicus* distribuídas entre quatro tratamentos: aspersão de solução de ácido láctico a 1, 1,5 e 2%, em temperatura ambiente de 33°C, e controle sem aspersão. O estudo 02 foi realizado com 200 meias carcaças de bovinos *Bos indicus* distribuídas entre quatro tratamentos: aspersão de solução de ácido láctico a 2, 2,5 e 3%, em temperatura de 55°C, e controle sem aspersão. Todas as meias carcaças foram amostradas para condição microbiana (bactérias mesófilas, bactérias psicrótróficas, bactérias ácido-láticas, enterobactérias, coliformes totais, *Escherichia coli* genérica, *E. coli* (STEC e EPEC). No estudo 02 foi realizada a avaliação da cor instrumental, por meio dos parâmetros L*, a*, b*, com colorímetro, na região da picanha e paleta das meias carcaças. Os resultados foram submetidos a testes de normalidade e homocedasticidade para adequação da análise de variância e do teste de comparações múltiplas à 5% de probabilidade. Considerando o estudo 01, antes do resfriamento, carcaças não tratadas apresentam em média 6,28 vezes maior chance de estarem contaminadas por coliformes em relação às tratadas com 2,0% de ácido láctico. O tratamento com ácido láctico reduz a contagem média de mesófilos e bactérias ácidos láticas em 0,34 e 0,21 log₁₀ UFC/cm² respectivamente, a cada unidade percentual de ácido láctico utilizada. Após o resfriamento, esta redução foi de 0,24 e 0,16 log₁₀ UFC/cm² para mesófilos e bactérias ácido láticas. No estudo 02, antes do resfriamento, o tratamento com ácido láctico reduz a contagem de enterobactérias, mesófilos, psicrótróficos, bactérias ácido láticas totais e bactérias ácido láticas homofermentativas em 0,12; 0,31; 0,23; 0,33 e 0,32 log₁₀ UFC/cm², respectivamente, a cada unidade percentual de ácido láctico. Os parâmetros de Luminosidade (L) e intensidade do vermelho (a*) foram afetados com a aspersão do ácido láctico.

Considerando o aspecto visual das carcaças e a redução da contagem bacteriana obtida neste estudo, recomenda-se o uso da aspersão de solução de ácido láctico a partir 2%, para tratamento antimicrobiano de carcaças bovinas *Bos indicus*.

Palavras-chave: validade comercial, ácidos orgânicos, bactérias deteriorantes, descontaminação, Nelore.

MICROBIAL EVALUATION AND COLOR OF BOVINE CARCASS (*Bos indicus*) TREATED WITH DIFFERENT SOLUTIONS OF LACTIC ACID

ABSTRACT

Contamination of bovine carcasses can lead to pathogens and affect food safety, which increases the risk of diseases to the consumer, as well as reducing the commercial value of meat and causing economic losses for the industry. In this sense, lactic acid has been used in the reduction of the initial microbial contamination of carcasses in the United States and Europe, however there is a lack of studies considering the reality of livestock and Brazilian slaughter technology. The aim of the present study was to determine the efficacy of spraying different lactic acid concentrations as an antimicrobial intervention in *Bos indicus* carcasses on the microbial load and its influence on carcass color. For this, the study was divided into two phases. Study 01 was performed with 132 *Bos indicus* half carcasses distributed among four treatments: 1, 1,5 and 2% lactic acid solution and control. In study 02, the instrumental color evaluation was performed using L *, a *, b *, with colorimeter. The results were submitted to normality and homoscedasticity tests for the adequacy of the analysis of variance and the multiple comparisons test with 5% of probability. Considering the study 01, before cooling, untreated carcasses had a mean of 6.28 times greater chance of being contaminated by coliforms than those treated with 2.0% of lactic acid. Treatment with lactic acid reduces the mean count of mesophiles and lactic acid bacteria by 0.34 and 0.21 log₁₀ CFU/cm², respectively, to each percentage unit of lactic acid used. After cooling, this reduction was 0.24 and 0.16 for mesophiles and lactic acid bacteria. In study 02, before cooling, treatment with lactic acid reduced the count of enterobacteria, mesophiles, psychrotrophic bacteria, total lactic acid bacteria and homofermentative lactic acid bacteria in 0.12; 0.31; 0.23; 0.33 and 0.32 log₁₀ CFU/cm², respectively, to each percentage unit of lactic acid. The parameters of Luminosity (L) and intensity of red (a *) were affected with the spray of lactic acid. Considering the visual appearance of the carcasses and the reduction of the bacterial count obtained in this study, it is recommended to use a spray of lactic acid solution from 2% for antimicrobial treatment of *Bos indicus* bovine carcasses.

Key-words: commercial validity, organic acids, deteriorating bacteria, decontamination, Nelore.

1 INTRODUÇÃO

O músculo de animais sadios é considerado estéril, sendo que a contaminação microbiana pode acontecer no processo de abate, por falhas de procedimentos operacionais, e a deterioração está diretamente relacionada com o crescimento de bactérias em sua superfície (SCHWACH, 2007). Quanto maior a carga inicial de bactérias, menor a validade comercial da carne, decorrente do aumento da atividade destes microrganismos (FORSYTHE et al., 2002). A deterioração dos alimentos gera grandes prejuízos econômicos, representando para a indústria da carne, varejistas e consumidores uma perda de até 40% de carne *in natura* (SPERBER, 2010).

Além do aspecto econômico, a contaminação da carne bovina pode representar perigo à inocuidade, se destacando como um dos principais alimentos envolvidos na ocorrência de zoonoses e infecções em humanos veiculadas por alimentos (EFSA, 2013a, 2013b). Nos últimos anos o grupo de bactérias *Escherichia coli* produtora de toxina “Shiga-like” – STEC, emergiu como o maior risco associado às carnes vermelhas, tanto em aspectos de saúde pública, como em barreiras técnicas comerciais e devoluções de mercadorias (DUFFY et al., 2014; EFSA, 2013a, 2013b). Os bovinos são os principais reservatórios de STEC e estão relacionados à maioria dos casos e mortes em humanos por este grupo de patógenos (BUNCIC et al., 2014; DUFFY et al., 2014; EFSA, 2013). Nos Estados Unidos, alimentos de origem bovina, especialmente crus ou malcozidos, estão relacionados a aproximadamente 75% dos surtos de *E. coli* STEC sorotipo O157 (CALLAWAY et al., 2009).

Apesar da intensificação dos procedimentos de Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, o uso de intervenções específicas de descontaminação pode contribuir com a redução de bactérias patogênicas e de microrganismos deteriorantes de carnes. Dentre estas técnicas, se destaca a aplicação de ácidos orgânicos, sendo o láctico o mais utilizado nos abates comerciais (BOSIVELAC et al., 2008). A aspersão do ácido láctico é um procedimento amplamente disseminado e regulamentado na Europa (UNIÃO EUROPEIA, 2013) e nos Estados Unidos (ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA, 2014), país este onde é considerada uma das práticas mais comuns para descontaminação de carne bovina *in natura* (FOULADKHAH et al., 2013).

A sua eficácia tem sido relatada por numerosos estudos (ARTHUR et al., 2004; PIPEK et al., 2005; HARRIS et al., 2006; ARTHUR et al., 2008), e o grau da descontaminação é aumentada por concentrações de ácido láctico superiores a 2% na solução aplicada (STOPFORTH et al., 2005). Em condições de contaminação natural da carcaça, já foram reportados efeitos sobre bactérias mesófilas (CASTILLO et al., 2001; BARBOZA de MARTINEZ et al., 2002; GILL; BADONI, 2004; BOSILEVAC et al.,

2008), coliformes (CASTILLO et al., 2001; BARBOZA de MARTINEZ et al., 2002), Enterobacteriaceae (BOSILEVAC et al., 2008) e *E. coli* (CASTILLO et al., 2001; BARBOZA de MARTINEZ et al., 2002). O efeito redutor da contaminação foi observado até mesmo em carcaças bovinas já resfriadas, sendo utilizado em concentração de 4% e temperatura de solução de 55° C (CASTILLO et al., 2001).

Apesar dos evidentes benefícios para redução microbiana, o uso de ácido láctico pode afetar algumas propriedades sensoriais da carne, como a cor, o sabor e o aroma deste alimento. Em carcaças bovinas naturalmente contaminadas, a aspersão de 2% de ácido láctico aumentou o *L**- luminosidade, e reduziu o *a** - intensidade de vermelho, sendo que este último teve seu valor aumentado após o resfriamento da carcaça (PIPEK et al., 2005).

A maioria dos estudos publicados considera a ação do ácido láctico em carcaças de bovinos taurinos, poucos estudos reportados considerando carcaças provenientes de *Bos indicus*, que compõem 80% do rebanho brasileiro, sendo que aqueles com características da raça Nelore representem quase a totalidade do rebanho de corte nacional (FERRAZ; FELÍCIO, 2010). Dentre as diferenças apresentadas entre animais zebuínos e taurinos, a pelagem se destaca e estudos publicados indicam que raças com pelos mais longos (por exemplo, Simental), têm maior potencial para apresentarem a carcaça contaminada (DAVIES et al., 2000).

No Brasil, o procedimento de aspersão de ácido láctico não está oficialmente implementado e existe carência de evidências científicas que considerem a realidade do país e do sistema de produção. Neste contexto, pesquisas nessa área podem contribuir para o desenvolvimento de um protocolo de aplicação de ácido láctico coerente com a realidade nacional. Portanto, com este estudo, espera-se estabelecer a concentração da solução de ácido láctico para aspersão em carcaças bovinas *Bos indicus*, adequada para o cenário nacional de produção proposto nesta pesquisa, que reduza a contaminação bacteriana natural inicial, sem interferir nos atributos sensoriais da carcaça.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Câmpus de Botucatu.

Foram realizados dois estudos em um abatedouro frigorífico de bovinos, localizado no Município de Mozarlândia, Estado de Goiás, para validação microbiana do uso de solução de ácido láctico sobre meias carcaças bovinas, utilizando boxe de aspersão localizado após a lavagem das mesmas. O estudo 01 ocorreu entre 29/02/2016 a 15/03/2016 e o estudo 02 foi realizado entre 08/09/2016 a 20/09/2016.

Em síntese, a Figura 1 esquematiza o fluxograma de trabalho realizado para a colheita e o processamento das amostras obtidas do estudo 01 e a Figura 2 representa o fluxograma de trabalho do estudo 02.

2.1 Seleção das meias carcaças esquerdas

Os critérios de seleção de cada lote, para ambos estudos, foram bovinos *Bos indicus*, com predomínio da raça Nelore, machos, não castrados e oriundos da mesma propriedade rural e sistema produtivo. O abate do lote selecionado foi sempre realizado no período da manhã para comportar os procedimentos amostrais e analíticos.

As carcaças foram divididas em meias carcaças, onde apenas as esquerdas foram utilizadas no experimento, sendo avaliadas quanto à cobertura de gordura, para caracterizá-las e padronizá-las.

O estudo 01 foi realizado com 3 (três) lotes de abate em dias distintos, totalizando 132 machos *Bos indicus*. Cada lote foi dividido igualmente em 4 (quatro) grupos de meias carcaças: sem aspersão (grupo controle) e tratadas com 1,0%, 1,5% ou 2,0% de ácido láctico utilizando água em temperatura ambiente ($\approx 33^{\circ}\text{C}$). A ordem de execução dos tratamentos foi alternada entre os lotes avaliados visando a aleatorização dos tratamentos dentro dos lotes. Este estudo foi realizado com 33 meias carcaças por tratamento ($n=33$).

O estudo 02 foi realizado com 4 (quatro) lotes de abate em dias distintos, totalizando 200 machos *Bos indicus*. Cada lote foi dividido igualmente em 4 (quatro) grupos de meias carcaças: sem aspersão (grupo controle); e tratadas com 2,0%, 2,5% ou 3,0% de ácido láctico utilizando água na temperatura de 55°C . A ordem de execução dos tratamentos foi alternada entre os lotes avaliados visando a aleatorização dos tratamentos dentro dos lotes. Em síntese, este estudo foi realizado com 50 meias carcaças por tratamento ($n=50$).

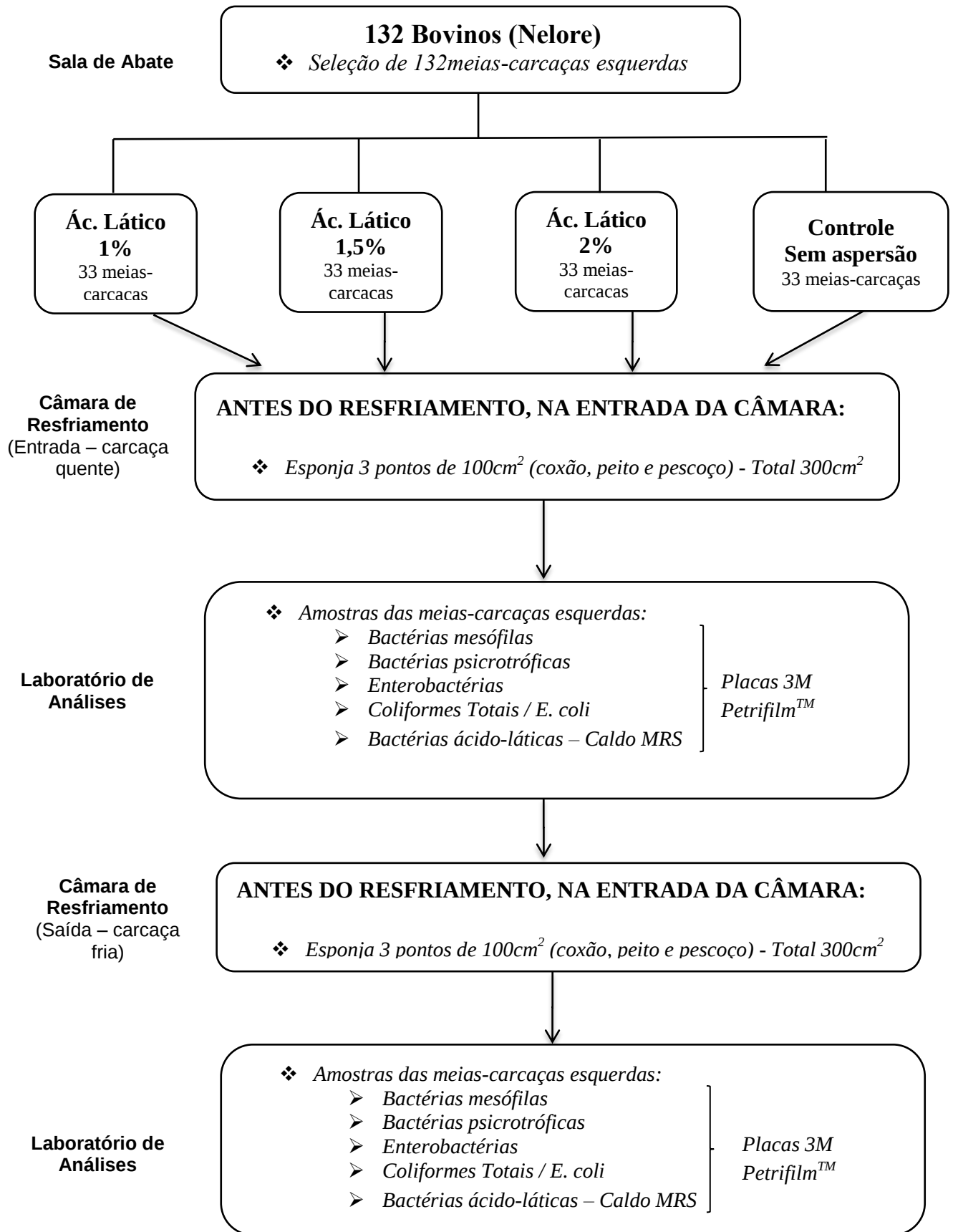


Figura 01 - Fluxograma da colheita e processamento das amostras de meias carcaças bovinas – Estudo -01.

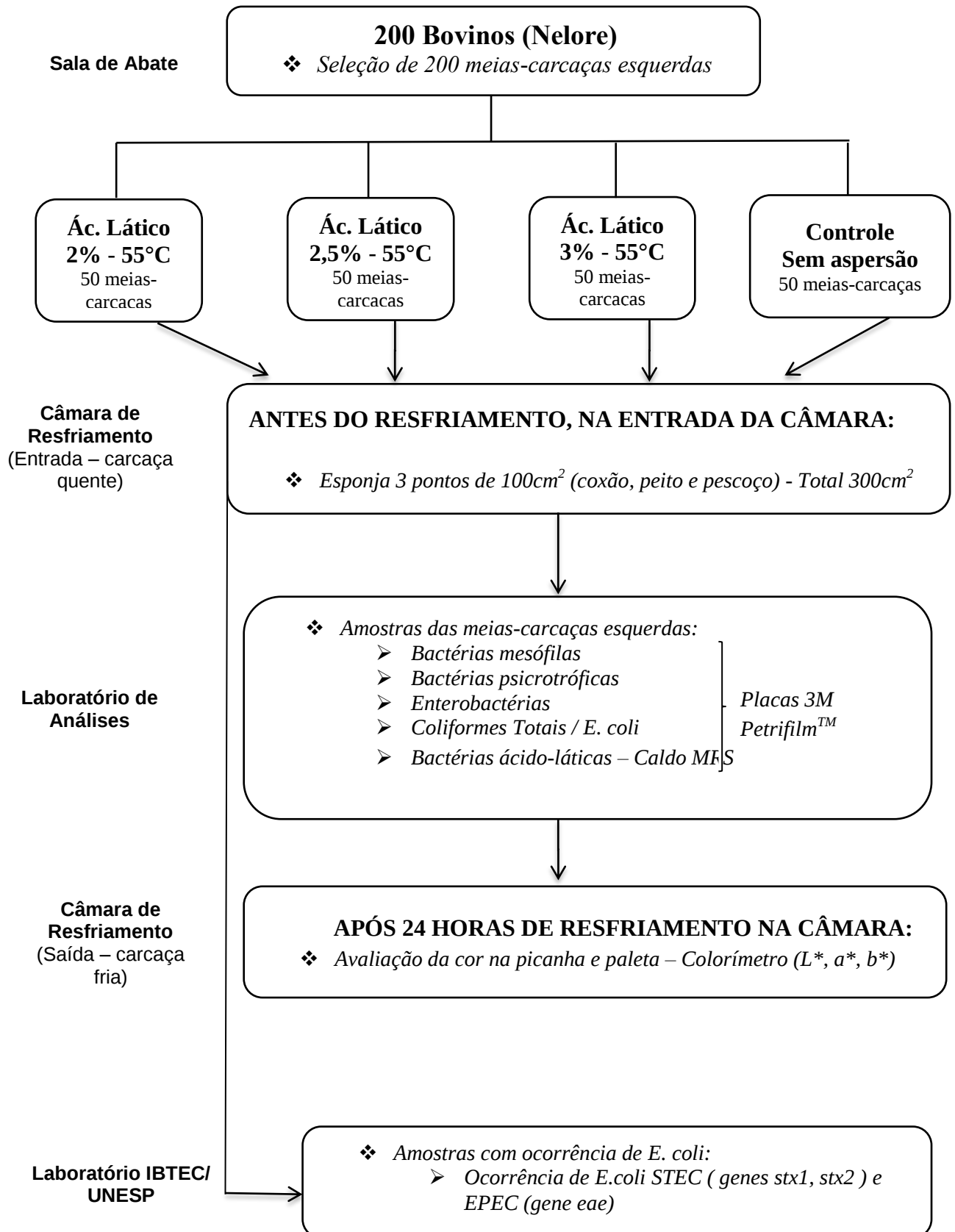


Figura 02 - Fluxograma da colheita e processamento das amostras de meias carcaças bovinas – Estudo 02.

2.2 Aplicação do ácido láctico

Após o abate e a lavagem das meias carcaças, estas foram encaminhadas pela nórea para o boxe de aspersão de ácido láctico, com pressão e vazão monitoradas. Este sistema de aspersão é composto por:

- 01 Tanque em Inox AISI 304 de diluição e homogeneização de ácido láctico, com serpentina para aquecimento e manutenção de temperatura do produto;
- 01 Bomba sanitária em aço inox AISI 304 para recirculação e homogeneização da solução;
- 01 Bomba sanitária em aço inox AISI 304 para alimentação da linha de aspersão;
- 01 Sistema de controle de temperatura do tanque através de PT100 na saída da bomba e controle de vazão por controle de velocidade da bomba de alimentação;
- 01 Cabine de aspersão de ácido láctico, construída em aço inox AISI 304, composta por dois “manifolds” em aço inox AISI 304 com bicos de aspersão. No estudo 01, a cabine de aspersão foi composta por duas fileiras paralelas verticais de 16 bicos, totalizando 32 bicos aspersores. No estudo 02, o boxe de aspersão foi composto por duas fileiras paralelas verticais de 09 bicos, totalizando 18 bicos aspersores.
- Controle de temperatura através de PID alimentado pelo valor da temperatura da solução na saída da bomba de alimentação da linha de aspersão.
- Controle de vazão da solução de ácido láctico através de inversor de frequência para variação da velocidade da bomba de alimentação da linha de aspersão de ácido.
- A aplicação se mantém contínua nas carcaças durante toda a produção, possuindo sistema de segurança e intertravamento automática com a nórea para parar a aplicação nas paradas de produção.

As soluções de 1, 1,5 e 2% de ácido láctico do estudo 01 e de 2, 2,5 e 3% de ácido láctico do estudo 02 foram preparadas manualmente utilizando água potável e o produto comercial PURAC® (Corbion), composto por 84,5-85,5% de ácido láctico natural, na forma isomérica óptica levógira [L(+)].

No estudo 01, em média, 4,2 litros de solução em temperatura ambiente ($\approx 33^{\circ}\text{C}$) foram aplicados em cada meia carcaça, e no estudo 02, em média 1,6 litros de solução na temperatura de 55°C foram aplicados em cada meia carcaça, imediatamente após a lavagem das mesmas em ambos estudos. A temperatura e o

potencial hidrogênionico (pH) foram mensurados antes e após a aplicação de cada tratamento, com auxílio de termômetro e peagômetro de punção direta (Modelo HI 99163 - Hanna Instruments), previamente calibrado com soluções de pH 4 e 7.

2.3 Procedimentos realizados nas meias carcaças esquerdas

No estudo 01, amostras de todas as meias carcaças esquerdas foram colhidas para análise em dois momentos: após 30 minutos da aplicação da solução e após 24 horas de resfriamento e foram analisadas para 5 (cinco) grupos microbianos: enterobactérias, coliformes, *Escherichia coli*, mesófilos e bactérias ácido-láticas.

No estudo 02, amostras de todas as meias carcaças esquerdas foram colhidas para análise após 30 minutos da aplicação da solução (única avaliação). Estas amostras foram analisadas para 8 (oito) grupos microbianos: enterobactérias, coliformes, *Escherichia coli*, mesófilos, psicrotróficos e bactérias ácido-láticas (total; homo e heterofermentativas).

2.3.1. Amostragem e análises microbianas

O método de amostragem das meias carcaças foi realizado segundo “Non-destructive methods, Sponge sampling method” da ISO 17604:2015 (ISO, 2015), utilizando esponja modelo 3M™ Dry Sponge, previamente umidificada) com 10 ml de solução salina 0,85% peptonada 0,1% estéril (SSP 0,1%), preparada conforme recomendações da Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003).

Cada meia carcaça foi amostrada com uma esponja em três regiões: 100 cm² da superfície do coxão-bola (*Musculus semimembranosus*, *M. semitendinosus*, *M. biceps femoris*), 100 cm² da superfície do peito (*M. cutaneous trunci*, *M. pectoralis superficialis*, *M. pectoralis profundus*) e 100 cm² da superfície do pescoço (*M. trapezius*, *M. brachiocephalicus*, *M. rhomboideus*), totalizando 300 cm² (ISO, 2015; USDA-FSIS, 1996). Estas áreas foram estabelecidas por moldes descartáveis estéreis, onde as esponjas foram esfregadas na região delimitada, iniciando o procedimento no sentido vertical, depois esfregando horizontalmente e, por fim, no sentido diagonal.

A esponja foi acondicionada em um saco estéril e mantida sob refrigeração à 4 °C até o momento da análise no laboratório do frigorífico, que ocorreu logo após a coleta. O responsável pela colheita trocou de luva estéril a cada esponja colhida.

Em seguida, as amostras foram individualmente submetidas à diluição seriada em escala decimal utilizando SSP 0,1% estéril, seguido do plaqueamento de até três diluições. No estudo 01, cada esponja foi analisada para enterobactérias segundo método AOAC 2003.01 (AOAC, 2012a), coliformes segundo método AOAC 991.14

(AOAC, 2012b), *Escherichia coli* β -glucuronidase positiva segundo método AOAC 998.08 (AOAC, 2012c) e bactérias mesófilas segundo método AOAC 990.12 (AOAC, 2012d), todos utilizando placas 3M™ Petrifilm™. A análise de bactérias ácido-láticas foi realizada segundo Ortolani et al. (2007), com diluição em caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe), inoculação em placas 3M™ Petrifilm™ AC, acondicionamento em anaerobiose (Anaerobac - Probac do Brasil) e incubação por 48 horas.

No estudo 02, cada esponja também foi analisada para bactérias psicotróficas utilizando placas 3M™ Petrifilm™ AC, com incubação a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 10 dias (APHA, 2001). Além disso, na contagem de bactérias ácido-láticas foram caracterizadas as proporções de colônias com (heterofermentativas) e sem formação de gás (homofermentativas).

Em ambos estudos foi utilizado o volume de trabalho de 25 ml, conforme recomendação da ISO 17604:2015 (ISO, 2015). Desta forma, considerando os 300 cm² da área de amostragem, o limite de detecção analítico para todos os parâmetros foi de 0,083 UFC/cm², ou seja, $-1,08 \log_{10}$ UFC/cm².

Para as análises moleculares de *E. coli* STEC, as placas Petrifilm™ EC das amostras que apresentaram crescimento de *E. coli* tiveram suas colônias repicadas por amostra para um tubo com 1,5 ml de Caldo Infusão Cérebro e Coração (Brains Heart Infusion – BHI). Esses tubos foram incubados por $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/24\text{h} \pm 2\text{h}$ e posteriormente congelados. Estas amostras congeladas foram avaliadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências – DMI/IBB/UNESP, Botucatu-SP para qualificação (ocorrência) dos patótipos de *Escherichia coli* EPEC (gene eae) e STEC (genes stx1 e stx2).

2.3.2. PCR quantitativa

2.3.2.1 Gene normalizador da etapa de extração do DNA

O gene *Rep* da região ORF-1 conservada do Circovírus Suíno Tipo 2 (PCV-2) foi utilizado como gene normalizador da etapa de extração e análise molecular, de modo a validar as extrações realizadas.

Durante a extração, todas as amostras, inclusive dos controles positivo e negativo, foram adicionadas de 15 μl de controle PCV-2 diluído 1:100. Este foi constituído pelo sobrenadante do lisado de cultura de células ST (testículo suíno) infectadas com PCV-2, que foram tratadas com 5% de Vertrell (DuPont®), clarificadas a $10.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante armazenado a -20°C .

Utilizando análise por qPCR, segundo protocolo descrito por Cruz e Araújo (2014), foram aceitas somente as extrações que apresentaram concentração viral de $4,2 \pm 0,2$ log cópias/ μ l.

2.3.2.2 Extração do DNA

Para a obtenção do DNA, 1,0 ml de cada tubo foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (“pellet”) foi suspenso em 1,0 ml de solução tampão de fosfato (PBS – 0,146M NaCl, 0,01M PO_4^{2-} , pH 7,2) e centrifugado a $10.000 \times g$ por 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi novamente desprezado e o sedimento ressuspenso em 185 μ l de PBS e 15 μ l de PCV-2. As amostras foram extraídas com auxílio do Chelex 100® (BIO-RAD) conforme as recomendações do fabricante na proporção 1:1 e concentração 10%. O produto adquirido foi armazenado em tubos de microcentrífuga com 1,5 ml (Axygen) para a realização das análises moleculares.

2.3.2.3 Curva padrão e controles negativos das análises

A cepa EDL-933 (“hemorrhagic colitis outbreak, Michigan”; PERNA et al., 2001; RILEY et al., 1983) de *E. coli* O157:H7 (positiva para os genes *eae*, *stx1* e *stx2*), e a cepa C-600 (*E. coli* derivada K-12) (APPLEYARD, 1954) de *E. coli* (negativa para estes genes), foram cultivadas em caldo LB [Difco™ LB Broth, Miller (Luria-Bertani) - BD], conforme Sezonov et al. (2007). A concentração aproximada destas cepas, em células por mililitro, foi determinada por densidade óptica (DO) a 600 nm utilizando espectrofotômetro (Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech), conforme descrito por Sezonov et al. (2007).

A partir desta aproximação, somente a concentração da cepa EDL-933 foi confirmada pela média da contagem em ágar MacConkey (Difco™ MacConkey Agar - BD), conforme Feng et al. (2016), de 3 diluições e 4 repetições de cada diluição (média final de 5×10^8 UFC/ml). Logo em seguida, ambas as cepas em caldo LB foram divididas em alíquotas de 500 μ l, que foram armazenadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml (Axygen), centrifugadas a $10.000 \times g$ por 5 minutos, desprezados os sobrenadantes e os “pellets” gerados foram congelados (-20°C).

Para a extração do DNA, os “pellets” foram adicionados de 285 μ l de tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4; 0,146 M NaCl; 0,01 M PO_4^{2-}) e cultivo PCV-2. Após agitação, o DNA foi extraído utilizando o kit “ilustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit – GE Healthcare”, com o protocolo “Protocol for the purification of genomic DNA from 50-300 μ l whole blood and its cell fractions”, entretanto, a etapa de eluição do DNA foi

realizada com 250 µl, de modo que a concentração do controle positivo fosse de 1×10^9 cópias por mililitro (ou 1×10^6 cópias/µl).

Com o intuito de aumentar a solubilidade, todas as diluições preparadas e as amostras analisadas foram previamente aquecidas a 37°C por 15 minutos a 500 rpm (ThermoMixer C - Eppendorf). Foram realizadas sete diluições seriadas de 1:10, com volume final de 200 µl, utilizando o “Elution buffer type 5”, até obter a concentração de 1×10^2 cópias/ml (ou 1×10^{-1} cópias/µl).

2.3.2.4 Análise qualitativa dos genes alvo

Todas as análises de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) com o 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems). Estas análises tiveram a mistura de reação com volume final de 20 µl, sendo destes, 10 µl de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) e 4,0 µl de amostra (DNA extraído). A concentração dos iniciadores (“primers”) dessalinizados (Sigma-Aldrich®), teve variação dependendo do gene alvo (Tabela 02).

A programação utilizada consistiu em 95°C por 10 minutos (desnaturação inicial), seguido por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 60 segundos (transcrição). Sendo ao final, determinada a curva de dissociação (“melting”), por meio da detecção da fluorescência do “SYBR green” (intercalante de DNA) durante aumento gradual de temperatura entre 60 e 95°C.

Cada análise de qPCR foi composta por 90 amostras, mais as duas últimas diluições com fluorescência detectável (“endpoint”) do controle positivo EDL-933, em duplicata, assim como, uma do controle negativo C-600 (utilizando a mesma diluição do controle positivo) e um controle negativo somente com água “Nuclease-Free” (Promega).

Para garantir a especificidade, as amostras com pico de dissociação (T_m) fora da variação $\pm 1^\circ\text{C}$ em relação ao T_m médio do controle positivo foram consideradas negativas para o gene alvo em questão. Com relação a sensibilidade, o C_t (“cycle threshold”) das reações foi obtido a partir do “threshold level” estabelecido automaticamente pelo programa para cada análise. Assim sendo, as amostras com C_t maior que o “ C_t endpoint” do controle positivo foram consideradas negativas para o gene alvo.

2.3.3. Avaliação da cor instrumental

Após 24 horas de resfriamento das meias carcaças em câmara fria, foi realizada a avaliação da cor instrumental na região da picanha (*Gluteus biceps*) e da

paleta (*Triceps brachialis*). Foram realizadas três leituras dentro de cada área, com auxílio de colorímetro Konica Minolta DL65, ângulo de visão de 0°, com iluminação difusa e componente especular, modelo CR 400, Câmera Co., Ltd Osaka, Japan. Os parâmetros avaliados foram L^* , a^* e b^* do sistema CIELab sendo que L^* representa a luminosidade ($L^* = 0$ preto e $L^* = 100$ branco), a^* representa intensidade de vermelho, variando de verde (0 a -60) a vermelho (0 a +60) e b^* intensidade do amarelo, variando de azul (0 a -60) ao amarelo (0 a +60) (AMSA, 2012). O colorímetro foi calibrado previamente às análises conforme orientação do fabricante.

2.4 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas no software estatístico SAS 9.4 TS1M2 (SAS Institute, Cary, NC, USA), considerando um nível de significância de 5%.

As variáveis resposta (parâmetros) com frequentes resultados abaixo do limite de detecção analítico (enterobactérias, coliformes, *E. coli* e bactérias ácido-láticas) foram analisadas de três formas: primeiro, como variáveis binárias utilizando todos os resultados, sendo presença=1 e ausência=0. Segundo, como variáveis quantitativas utilizando somente os resultados positivos obtidos. Terceiro, como variáveis quantitativas utilizando todos os resultados obtidos e sendo adotado o valor de 0,083 UFC/cm² (limite de detecção analítico) para os resultados abaixo do limite de detecção analítico (negativos).

Todos os parâmetros foram analisados com modelos lineares mistos (“Proc Mixed”) e mistos generalizados (“Proc Glimmix”). Os resíduos dessas análises foram avaliados quanto a normalidade e a homocedasticidade (homogeneidade da variância), utilizando ferramentas descritivas como gráfico de dispersão de resíduos versus valores preditos (derivados do modelo estatístico construído) e os gráficos “box-plot” e histograma. Os valores de resíduos que ultrapassaram os desvios de dispersão dos dados em torno do valor 0 (zero) foram investigados e considerados “outliers” quando devido. Nenhum parâmetro analisado teve mais do que 3 (três) valores desconsiderados. Os dados contínuos de todos os parâmetros foram transformados em escala logarítmica de base 10 por apresentarem melhores ajustes aos modelos propostos e utilizados.

A análise global (**Tabela 2**) foi realizada somente com os dados contínuos do estudo 01 obtidos das amostras colhidas antes do resfriamento, mais todos os dados contínuos do estudo 02. As variáveis comuns à ambos os estudos foram submetidas à análise de regressão múltipla utilizando o procedimento “Proc Mixed” do SAS, com “tratamentos” (controle; 1, 1,5, 2, 2,5 e 3% de ácido lático) como efeito fixo, “estudos” (01 e 02) e “dia de abate” (sete lotes de abate em dias distintos) como efeitos

aleatórios e “animal” (total de 332 bovinos) como unidade experimental. A aproximação de Kenward-Roger foi utilizada para ajustar os graus de liberdade. A análise de todos os parâmetros foi realizada testando-se a significância de equações de terceiro (cúbica), de segundo (quadrática) e de primeiro (linear) grau.

Os dados do estudo 01 foram submetidos à análise de variância (**Tabela 07**) utilizando o procedimento “Proc Mixed” do SAS, com “tratamentos” (controle; 1, 1,5 e 2% de ácido láctico), “momentos” (antes e após o resfriamento) e a sua interação como efeitos fixos, “dia de abate” como efeito aleatório e “animal” como unidade experimental. A unidade experimental (“animal”) foi considerada medida repetida dentro de “momentos”, sendo utilizada a estrutura de covariância não estruturada para todos os parâmetros avaliados. A aproximação de Kenward-Roger foi utilizada para ajustar os graus de liberdade e o teste de Tukey-Kramer para ajustar as comparações múltiplas.

Os dados binários do estudo 01 (**Tabela 3**) foram submetidos a análises de regressão logística utilizando o procedimento “Proc Glimmix” do SAS, com “tratamentos”, “momentos” e a sua interação como efeitos fixos, “dia de abate” como efeito aleatório e “animal” como unidade experimental. A unidade experimental (“animal”) foi considerada medida repetida dentro de “momentos”, sendo utilizada a estrutura de covariância não estruturada para todos os parâmetros avaliados. A aproximação de Kenward-Roger foi utilizada para ajustar os graus de liberdade e o teste de Tukey-Kramer para ajustar as comparações múltiplas. Predição linear marginal (“noblu”) adicionada da fórmula $y = \exp(x)/[1+\exp(x)]$ foi utilizada para calcular as ocorrências ajustadas e os respectivos intervalos de confiança com 95% de probabilidade.

A análise estatística preliminar dos resultados do estudo 01 indicou ausência de interação estatística ($P > 0,05$) entre o tratamento e o resfriamento para todos os parâmetros avaliados, ou seja, a resposta dos tratamentos (controle, 1,0%, 1,5% e 2,0% de ácido láctico) foi sempre a mesma, independente do momento de avaliação das carcaças (antes ou após 24 horas de resfriamento). Portanto, devido a limitações operacionais e laboratoriais e, com o intuito de ampliar ao máximo o tamanho amostral, o estudo 02 foi realizado com a avaliação das carcaças em um único momento (antes do resfriamento). Os dados do estudo 01 também foram submetidos à análises estatísticas sem considerar o efeito “momento” (antes e após o resfriamento).

Os dados quantitativos, mas considerando bancos de dados isolados (estudo 01 antes do resfriamento; estudo 01 após 24 horas de resfriamento; e estudo 02), foram submetidos à análise de regressão múltipla (**Tabelas 5 e 10**), de forma semelhante à análise global, mas sem “estudos” (2 e 3) como efeito aleatório. Estes

mesmos bancos de dados também foram submetidos à análise de variância (**Tabelas 6 e 11**), mas utilizando o procedimento “Proc Mixed” do SAS, também com “tratamentos” como efeito fixo, “dia de abate” como efeito aleatório e “animal” como unidade experimental. A aproximação de Kenward-Roger foi utilizada para ajustar os graus de liberdade e o teste de Tukey-Kramer para ajustar as comparações múltiplas.

Os dados binários, mas considerando bancos de dados isolados [estudo 01 antes do resfriamento (**Tabela 2**); estudo 01 após 24 horas de resfriamento (**Tabela 4**); e estudo 02 (**Tabelas 8 e 9**)], foram submetidas à análises de regressão logística com razão de chances utilizando o procedimento “Proc Glimmix” do SAS, com “tratamentos” como efeito fixo, “dia de abate” como efeito aleatório e “animal” como unidade experimental. A aproximação de Kenward-Roger foi utilizada para ajustar os graus de liberdade e o teste de Tukey-Kramer para ajustar as comparações múltiplas. Predição linear marginal (“noblup”) adicionada da fórmula “ $y = \exp(x)/[1+\exp(x)]$ ” foi utilizada para calcular as ocorrências ajustadas e os respectivos intervalos de confiança com 95% de probabilidade. A interpretação deste tipo de análise deve levar em consideração primeiro o valor de P e depois, somente se $P < 0,05$, o resultado da Razão de Chances.

Tabela 1– Descrição dos iniciadores utilizados (“primers”)

Parâmetros	Sequência “Primer” (5'-3')	Tamanho “Amplicon”	Referência	Concentração
Gene <i>Rep</i> (ORF-1 / PCV-2) ¹				
“Forward primer”	GAT GAT CTA CTG AGA CTG TGT GA	152pb	Ladekjaer-Mikkelsen et al. (2002)	0,25 µM
“Reverse primer”	AGA GCT TCT ACA GCT GGG ACA			
Gene <i>eae</i> (<i>E. coli</i> EPEC)				
“Forward primer”	ACT GGA CTT CTT ATT RCC GTT CTA TG	189pb	Hardeggen et al. (2010)	0,25 µM
“Reverse primer”	CCT AAA CGG GTA TTA TCA CCA GA			
Gene <i>stx</i> ₁ (<i>E. coli</i> STEC)				
“Forward primer”	AGT CGT ACG GGG ATG CAG ATA AAT	418pb	Bellin et al. (2001)	0,15 µM
“Reverse primer”	CCG GAC ACA TAG AAG GAA ACT CAT			
Gene <i>stx</i> ₂ (<i>E. coli</i> STEC)				
“Forward primer”	GAT GTT TAT GGC GGT TTT ATT TGC	83pb	Yoshitomi et al. (2006)	0,15 µM
“Reverse primer”	TGG AAA ACT CAA TTT TAC CTT TAG CA			

¹ Gene normalizador utilizado.

3 RESULTADOS

3.1 Indicadores higiênico-sanitários

3.1.1 Análise global (estudos 01 e 02) – Antes do Resfriamento

Nas condições estabelecidas pelos estudos 01 e 02, foi possível determinar equações lineares de predição estatisticamente significativas para todos os grupos bacterianos, com exceção de *E. coli* (Tabela 2). Por meio da equação obtida para a contagem de enterobactérias, por exemplo, “ $Y = -0,12 \cdot X - 0,21$ ”, sendo: “Y”, a contagem de em $\log_{10}$ UFC/cm², e “X”, a concentração (%) de ácido láctico utilizada, é possível determinar que carcaças bovinas tratadas com solução de ácido láctico na concentração de 2% terão redução média de 0,24 $\log_{10}$ UFC/cm² na contagem de enterobactérias, resultando em uma contagem média de -0,45 $\log_{10}$ UFC/cm².

Tabela 2- Equação linear para predição da contagem em $\log_{10}$ UFC/cm² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com solução de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento

Parâmetros	Intercepto ¹	EP ²	I.C. 95% ³	Coefficiente Angular ⁴	EP ⁵	I.C. 95% ⁶	Valor P
Enterobactérias	-0,21	0,10	(-0,43 a 0,01)	-0,12	0,03	(-0,17 a -0,06)	<0,0001
Coliformes	-0,45	0,11	(-1,36 a 0,46)	-0,05	0,03	(-0,10 a -0,002)	0,0427
<i>E. coli</i>	-0,81	0,05	(-0,93 a -0,69)	-0,03	0,02	(-0,07 a 0,0003)	0,0524
Mesófilos	1,91	0,33	(-1,99 a 5,81)	-0,32	0,03	(-0,38 a -0,26)	<0,0001
BAL ⁷	0,41	0,25	(-2,35 a 3,17)	-0,31	0,03	(-0,36 a -0,25)	<0,0001

¹ Intercepto da equação obtida por modelo linear misto (regressão linear múltipla). Este valor representa a **contagem inicial do grupo bacteriano na meia-carcaça sem tratamento com ácido láctico**.

² Erro padrão do intercepto da equação.

³ Intervalo de confiança de 95% do intercepto da equação.

⁴ Coeficiente angular da equação obtida por modelo linear misto (regressão linear múltipla). Este valor representa a **taxa de redução do grupo bacteriano por percentual de ácido láctico (concentração)** utilizado para tratar as meias carcaças, ou seja, a **eficiência do ácido láctico**. Equação estatisticamente válida para concentrações entre 0 e 3% de ácido láctico, independente da temperatura utilizada.

⁵ Erro padrão do coeficiente angular da equação.

⁶ Intervalo de confiança de 95% do coeficiente angular da equação.

⁷ Bactérias ácido-láticas.

A partir da análise global (Tabela 2) foi possível detectar que o tratamento com ácido láctico reduz a contagem média de enterobactérias em 0,12 $\log_{10}$ UFC/cm² ($P < 0,0001$) a cada unidade percentual de ácido láctico utilizada. Deste mesmo modo, também foi possível determinar taxas de redução para as contagens médias de coliformes (0,05 $\log_{10}$ UFC/cm²/‰ de ácido láctico; $P = 0,0427$), de mesófilos ($\log_{10}$ UFC/cm²/‰ de ácido láctico; $P < 0,0001$) e de BAL (0,31 $\log_{10}$ UFC/cm²/‰ de ácido láctico; $P < 0,0001$). Para *E. coli* foi obtida taxa de redução com tendência estatística (0,03 $\log_{10}$ UFC/cm²/‰ de ácido láctico; $P = 0,0524$), embora o valor $P = 0,0524$ seja muito próximo do nível de significância (valor $P < 0,05$).

3.1.2 Resultados do Estudo 01

Nas condições estabelecidas pelo estudo 01, com valor $P = 0,0379$, meias carcaças bovinas não tratadas (controle) apresentaram em média 6,28 vezes maior chance de estarem contaminadas com coliformes do que às meias carcaças tratadas com solução de 2% de ácido láctico. A ocorrência no grupo controle (91,32% de positivos) foi superior ao grupo tratado com 2% de ácido láctico (62,21%), quando avaliadas antes do resfriamento (Tabela 3).

Tabela 3- Razão de chances e ocorrência ajustada dos grupos bacterianos nas meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento

Parâmetros	Coeficiente	EP ¹	Valor P	OR ²	I.C. 95% ³	Ocorrência Ajustada (%) ⁴	I.C. 95% ⁵
Enterobactérias							
Intercepto	3,41	1,05					
Tratamentos			0,2773				
Controle	Referência			Referência		96,80	(78,08 a 99,66)
1,0%	-1,12	1,19		0,33	(0,03 a 3,40)	90,79	(68,51 a 97,88)
1,5%	-1,98	1,11		0,14	(0,02 a 1,25)	80,68	(54,26 a 94,08)
2,0%	-1,73	1,13		0,18	(0,02 a 1,65)	84,23	(60,22 a 95,75)
Coliformes							
Intercepto	1,18	0,46					
Tratamentos			0,0379				
Controle	1,18	0,73		3,24	(0,76 a 13,83)	91,32 ^a	(68,61 a 97,79)
1,0%	Referência			Referência		76,45 ^{ab}	(44,80 a 91,98)
1,5%	0,58	0,64		1,78	(0,50 a 6,99)	82,25 ^{ab}	(57,91 a 95,29)
2,0%	-0,66	0,55		0,52	(0,18 a 1,52)	62,21 ^b	(30,83 a 84,51)
Intercepto	1,75	0,55					
Tratamentos							
Controle	0,60	0,78		1,82	(0,39 a 8,50)		
1,0%	-0,58	0,64		0,561	(0,16 a 1,99)		
1,5%	Referência			Referência			
2,0%	-1,24	0,61		0,29	(0,09 a 0,97)		
Intercepto	0,52	0,44					
Tratamentos							
Controle	1,84	0,70		6,28*	(1,56 a 25,23)		
1,0%	0,66	0,55		1,94	(0,66 a 5,71)		
1,5%	1,24	0,61		3,45*	(1,04 a 11,52)		
2,0%	Referência			Referência			

¹ Erro padrão.

² Razão de chances ("odds ratio") derivada do modelo linear misto generalizado (regressão logística).

³ Intervalo de confiança de 95% da razão de chances.

⁴ Ocorrência (predição linear marginal) derivada do modelo linear misto generalizado (regressão logística).

⁵ Intervalo de confiança de 95% da ocorrência ajustada.

* São significativas as comparações com o número 1 ausente no intervalo de confiança de 95%.

a,b,c,d Valores com letras distintas são diferentes (Valor $P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

Tabela 3: Continuação

Parâmetros	Coeficiente	EP ¹	Valor P	OR ²	I.C. 95% ³	Ocorrência Ajustada (%) ⁴	I.C. 95% ⁵
E. coli							
Intercepto	0,39	0,52	0,0944				
Tratamentos							
Controle	Referência			Referência		59,70	(42,45 a 81,16)
1,0%	-1,09	0,53		0,34	(0,12 a 0,95)	33,23	(19,38 a 58,23)
1,5%	-0,43	0,52		0,65	(0,23 a 1,82)	49,02	(32,86 a 73,05)
2,0%	-1,11	0,52		0,33	(0,12 a 0,92)	32,70	(21,37 a 59,39)
BAL							
Intercepto	2,42	0,81	0,5557				
Tratamentos							
Controle	Referência			Referência		91,82	(66,84 a 95,96)
1,0%	-0,38	0,74		0,69	(0,16 a 2,96)	88,52	(61,41 a 94,67)
1,5%	-0,04	0,77		0,96	(0,21 a 4,41)	91,54	(66,10 a 95,86)
2,0%	-0,83	0,69		0,43	(0,11 a 1,69)	82,99	(51,67 a 89,51)

¹ Erro padrão.² Razão de chances (“odds ratio”) derivada do modelo linear misto generalizado (regressão logística).³ Intervalo de confiança de 95% da razão de chances.⁴ Ocorrência (predição linear marginal) derivada do modelo linear misto generalizado (regressão logística).⁵ Intervalo de confiança de 95% da ocorrência ajustada.

* São significativas as comparações com o número 1 ausente no intervalo de confiança de 95%.

a,b,c,d Valores com letras distintas são diferentes (Valor *P* < 0,05), considerando o teste de Tukey-Kramer.

Nas condições estabelecidas pelo estudo 01, com valor *P* = 0,0136, meias carcaças não tratadas apresentam em média 3,83, 5,50 e 6,03 vezes maiores chances de estarem contaminadas por BAL em relação respectivamente às tratadas com 1,0%, 1,5% e 2,0% de ácido láctico. Além disso, ocorrência de BAL em carcaças não tratadas (84,96%) foi maior (*P* = 0,0136) que nas tratadas respectivamente com 1,5% (50,67%) e 2,0% (48,38%) de ácido láctico quando considerado o momento após o resfriamento (Tabela 4).

Tabela 4 - Razão de chances e ocorrência ajustada dos grupos bacterianos nas meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido lático e avaliadas após 24 horas de resfriamento

Parâmetros	Coefficiente	EP ¹	Valor P	OR ²	I.C. 95% ³	Ocorrência Ajustada (%) ⁴	I.C. 95% ⁵
Enterobactérias							
Intercepto	0,18	0,35					
Tratamentos			0,6305				
Controle	Referência			Referência		54,55	(1,39 a 99,03)
1,0%	-0,36	0,49		0,69	(0,001 a 371,47)	45,46	(0,97 a 98,61)
1,5%	-0,56	0,50		0,57	(<0,001 a 334,90)	40,63	(0,70 a 98,51)
2,0%	0,17	0,49		1,19	(0,002 a 630,34)	58,32	(1,68 a 99,17)
Coliformes							
Intercepto	-0,53	0,39					
Tratamentos			0,7066				
Controle	Referência			Referência		37,05	(17,74 a 60,11)
1,0%	0,36	0,51		1,44	(0,53 a 3,91)	45,34	(23,84 a 68,82)
1,5%	0,43	0,51		1,54	(0,56 a 4,19)	47,46	(25,18 a 69,67)
2,0%	-0,04	0,51		0,96	(0,35 a 2,63)	36,07	(17,17 a 58,84)
E. coli							
Intercepto	-2,22	0,70					
Tratamentos			0,8521				
Controle	Referência			Referência		9,80	(3,80 a 34,42)
1,0%	0,55	0,71		1,73	(0,43 a 7,01)	15,79	(6,41 a 44,16)
1,5%	0,51	0,71		1,66	(0,41 a 6,72)	15,28	(6,95 a 43,82)
2,0%	0,23	0,73		1,26	(0,30 a 5,30)	12,03	(5,11 a 37,98)
BAL							
Intercepto	0,39	0,65					
Tratamentos			0,0136				
Controle	1,34	0,59		3,83*	(1,19 a 12,35)	84,96 ^a	(62,09 a 92,54)
1,0%	Referência			Referência		59,63 ^{ab}	(36,37 a 76,23)
1,5%	-0,36	0,53		0,70	(0,25 a 1,98)	50,67 ^b	(29,92 a 69,80)
2,0%	-0,45	0,52		0,64	(0,23 a 1,76)	48,38 ^b	(25,25 a 64,38)
Intercepto	0,03	0,66					
Tratamentos							
Controle	1,70	0,60		5,50*	(1,68 a 17,97)		
1,0%	0,36	0,53		1,44	(0,51 a 4,08)		
1,5%	Referência			Referência			
2,0%	-0,91	0,52		0,91	(0,33 a 2,56)		
Intercepto	-0,06	0,65					
Tratamentos							
Controle	1,80	0,58		6,03*	(1,89 a 19,17)		
1,0%	0,45	0,52		1,58	(0,57 a 4,38)		
1,5%	0,09	0,52		1,10	(0,39 a 3,07)		
2,0%	Referência			Referência			

¹Erro padrão.

²Razão de chances ("odds ratio") derivada do modelo linear misto generalizado (regr. logística).

³Intervalo de confiança de 95% da razão de chances.

⁴Ocorrência derivada do modelo linear misto generalizado (regressão logística).

⁵Intervalo de confiança de 95% da ocorrência ajustada.

* Significativas as comparações com o número 1 ausente no intervalo de confiança de 95%.

^{a,b,c,d} Valores com letras distintas são diferentes (Valor $P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

Tabela 5- Equação linear para predição da contagem em $\log_{10}$ UFC/cm² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com solução de ácido láctico

Parâmetros	Intercepto ¹	EP ²	I.C. 95% ³	Coeficiente Angular ⁴	EP ⁵	I.C. 95% ⁶	Valor <i>P</i>
Antes do resfriamento							
Mesófilos	2,27	0,19	(1,69 a 2,85)	-0,34	0,08	(-0,50 a - 0,19)	<0,0001
BAL ⁷	0,08	0,18	(-0,50 a 0,66)	-0,21	0,06	(-0,33 a - 0,09)	0,0008
Após 24 horas de resfriamento							
Mesófilos	1,58	0,19	(0,99 a 2,18)	-0,24	0,08	(-0,39 a - 0,09)	0,0024
BAL ⁷	-0,48	0,15	(-1,02 a 0,05)	-0,16	0,05	(-0,25 a - 0,06)	0,0011

¹ Intercepto da equação obtida por modelo linear misto (regressão linear múltipla). Este valor representa a **contagem inicial do grupo bacteriano na meia-carcaça sem tratamento com ácido láctico**.

² Erro padrão do intercepto da equação.

³ Intervalo de confiança de 95% do intercepto da equação.

⁴ Coeficiente angular da equação obtida por modelo linear misto (regressão linear múltipla). Este valor representa a **taxa de redução do grupo bacteriano por percentual de ácido láctico (concentração)** utilizado para tratar as meias carcaças, ou seja, a **eficiência do ácido láctico**. Equação estatisticamente válida para concentrações entre 0 e 2% de ácido láctico.

⁵ Erro padrão do coeficiente angular da equação.

⁶ Intervalo de confiança de 95% do coeficiente angular da equação.

⁷ Bactérias ácido-láticas.

Nas condições estabelecidas pelo estudo 01, foi possível determinar equações lineares de predição estatisticamente significativas ($P < 0,001$) para mesófilos e bactérias ácido-láticas, tanto antes como após o resfriamento (Tabela 5). A cada percentual adicional de ácido láctico (taxa de redução linear) foi possível constatar uma redução de 0,34 e 0,21 $\log_{10}$ UFC/cm² para, respectivamente, mesófilos e bactérias ácido-láticas antes do resfriamento e redução de 0,24 e 0,16 $\log_{10}$ UFC/cm² após o resfriamento. Esta redução é estatisticamente válida para concentrações de ácido láctico entre 0 e 2%.

Considerando o momento antes do resfriamento, a contagem média de mesófilos em carcaças tratadas com 2,0% de ácido láctico (1,52 $\log_{10}$ UFC/cm²) foi menor ($P = 0,0003$) que no grupo controle (2,24 $\log_{10}$ UFC/cm²). A contagem média de BAL em carcaças tratadas com 2,0% de ácido láctico (-0,37 $\log_{10}$ UFC/cm²) foi menor ($P = 0,0087$) que no grupo controle (0,06 $\log_{10}$ UFC/cm²) (Tabela 6).

Em relação ao momento após o resfriamento a contagem média de mesófilos em carcaças tratadas com 2,0% de ácido láctico (1,08 $\log_{10}$ UFC/cm²) foi menor ($P = 0,0238$) que no grupo controle (1,57 $\log_{10}$ UFC/cm²). A contagem média de BAL em

carcaças tratadas com 2,0% de ácido láctico ($-0,79 \log_{10}$ UFC/cm²) foi menor ($P = 0,0100$) que no grupo controle ($-0,46 \log_{10}$ UFC/cm²) (Tabela 6).

Tabela 6- Média de contagem em $\log_{10}$ UFC/cm² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico

Parâmetros	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor P
	Controle	1,0%	1,5%	2,0%		
Antes do resfriamento						
Enterobactérias						
Todos ³	-0,21	-0,30	-0,32	-0,41	0,11	0,4498
Positivos ⁴	-0,34	-0,36	-0,30	-0,39	0,10	0,9373
Coliformes						
Todos ³	-0,31	-0,41	-0,30	-0,58	0,11	0,0965
Positivos ⁴	-0,42	-0,41	-0,34	-0,38	0,09	0,9358
<i>E. coli</i>						
Todos ³	-0,82	-0,89	-0,82	-0,96	0,08	0,1348
Positivos ⁴	-0,86	-0,72	-0,75	-0,89	0,11	0,2879
Mesófilos	2,24 ^a	1,95 ^a	1,83 ^{ab}	1,52 ^b	0,20	0,0003
BAL ⁵	0,06 ^a	-0,10 ^{ab}	-0,21 ^{ab}	-0,37 ^b	0,18	0,0087
Após 24 horas de resfriamento						
Enterobactérias						
Todos ³	-0,79	-0,79	-0,78	-0,82	0,06	0,9703
Positivos ⁴	-0,74	-0,69	-0,43	-0,80	0,09	0,0433*
Coliformes						
Todos ³	-0,91	-0,86	-0,76	-0,92	0,06	0,1533
Positivos ⁴	-0,73	-0,78	-0,53	-0,86	0,11	0,1345
<i>E. coli</i>						
Todos ³	-1,04	-1,01	-1,02	-1,04	0,03	0,8310
Positivos ⁴	-1,00	-0,95	-0,92	-0,96	0,10	0,9511
Mesófilos	1,57 ^a	1,34 ^{ab}	1,28 ^{ab}	1,08 ^b	0,20	0,0238
BAL ⁵	-0,46 ^a	-0,69 ^{ab}	-0,69 ^{ab}	-0,79 ^b	0,15	0,0100

¹ Média dos quadrados mínimos obtida por modelo linear misto (análise de variância).

² Erro padrão médio.

³ Análise estatística considerando todos os resultados. Para os resultados negativos foi adotado o valor do limite de detecção analítico de $-1,08 \log_{10}$ UFC/cm².

⁴ Análise estatística considerando somente os resultados positivos (acima do limite de detecção analítico).

⁵ Bactérias ácido-láticas.

* Valor $P > 0,05$ em todas as comparações múltiplas, considerando o teste de Tukey-Kramer.

No Estudo 01 foram testadas todas as possíveis interações entre os efeitos tratamento e momento (antes e após o resfriamento) para todos os grupos bacterianos, e em todos os casos, não houve interação estatisticamente significativa (Tabela 7).

Tabela 7- Média de contagem em $\log_{10}$ UFC/cm² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes e após 24 horas de resfriamento

Parâmetro	Tratamento (T) ¹				EPM ²	Resfriamento (R) ¹		EPM ²	Valor <i>P</i>		
	Controle	1,0%	1,5%	2,0%		Antes	Após		T	R	T*R ³
Enterobactérias											
Todos ⁴	-0,49	-0,54	-0,52	-0,59	0,07	-0,28 ^a	-0,79 ^b	0,04	0,7461	< 0,0001	0,5445
Positivos ⁵	-0,55	-0,52	-0,37	-0,60	0,07	-0,34 ^a	-0,68 ^b	0,05	0,1360	< 0,0001	0,4023
Coliformes											
Todos ⁴	-0,61	-0,64	-0,53	-0,75	0,06	-0,40 ^a	-0,86 ^b	0,04	0,0915	< 0,0001	0,1224
Positivos ⁵	-0,58	-0,60	-0,44	-0,62	0,07	-0,39 ^a	-0,74 ^b	0,05	0,2481	< 0,0001	0,5177
<i>E. coli</i>											
Todos ⁴	-0,93	-0,95	-0,92	-1,00	0,05	-0,86 ^a	-1,04 ^b	0,04	0,2355	< 0,0001	0,1598
Positivos ⁵	-0,95	-0,83	-0,86	-0,96	0,09	-0,79 ^a	-1,02 ^b	0,08	0,5365	0,0018	0,9539
Mesófilos	1,93 ^a	1,64 ^{ab}	1,56 ^{bc}	1,26 ^c	0,20	1,89 ^a	1,30 ^b	0,18	< 0,0001	< 0,0001	0,8066
BAL ⁶	-0,22 ^a	-0,40 ^{ab}	-0,47 ^b	-0,59 ^b	0,13	-0,20 ^a	-0,63 ^b	0,12	0,0003	< 0,0001	0,6743

¹ Média dos quadrados mínimos obtida por modelo linear misto (análise de variância).

² Erro padrão médio.

³ Interação entre os efeitos fixos: tratamento (controle, 1,0, 1,5 e 2,0% de ácido láctico) e resfriamento (avaliação antes e depois do resfriamento).

⁴ Análise estatística considerando todos os resultados. Para os resultados negativos foi adotado o valor do limite de detecção analítico de -1,08 $\log_{10}$ UFC/cm².

⁵ Análise estatística considerando somente os resultados positivos (acima do limite de detecção analítico).

⁶ Bactérias ácido-láticas.

^{a,b,c,d} Valores com letras distintas na mesma linha e para o mesmo efeito (T ou R) são diferentes (Valor *P* < 0,05), considerando o teste de Tukey-Kramer.

3.1.3 Resultados do Estudo 02

Nas condições estabelecidas pelo estudo 02, meias carcaças bovinas não tratadas apresentam em média 3,64 e 4,00 vezes maiores chances de estarem contaminadas com enterobactérias do que meias carcaças tratadas respectivamente com solução de 2,5% e de 3,0% de ácido láctico, além disso, a ocorrência no grupo controle (86,43% de positivos) foi superior ao grupo tratado com 3% de ácido láctico (61,44% de positivos), quando avaliadas antes do resfriamento (Tabela 8).

Tabela 8 - Razão de chances e ocorrência ajustada dos grupos bacterianos nas meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento

Parâmetros	Coeficiente	EP ¹	Valor P	OR ²	I.C. 95% ³	Ocorrência Ajustada (%) ⁴	I.C. 95% ⁵
Enterobactérias							
Intercepto	0,53	0,52	0,0272				
Tratamentos							
Controle	1,32	0,54		3,75*	(1,29 a 10,90)	86,43 ^a	(67,75 a 92,96)
2,0%	Referência			Referência		62,97 ^{ab}	(49,24 a 82,45)
2,5%	0,03	0,47		1,03	(0,41 a 2,59)	63,61 ^{ab}	(42,06 a 77,38)
3,0%	-0,07	0,47		0,94	(0,37 a 2,35)	61,44 ^b	(40,07 a 75,78)
Intercepto	0,56	0,50					
Tratamentos							
Controle	1,29	0,50		3,64*	(1,36 a 9,77)		
2,0%	-0,03	0,47		0,97	(0,39 a 2,45)		
2,5%	Referência			Referência			
3,0%	-0,09	0,43		0,91	(0,39 a 2,13)		
Intercepto	0,47	0,50					
Tratamentos							
Controle	1,39	0,50		4,00*	(1,50 a 10,70)		
2,0%	0,07	0,47		1,07	(0,43 a 2,68)		
2,5%	0,09	0,43		1,10	(0,47 a 2,57)		
3,0%	Referência			Referência			
Coliformes							
Intercepto	0,83	0,54	0,375				
Tratamentos							
Controle	Referência			Referência		69,66	(47,97 a 80,39)
2,0%	-0,53	0,47		0,59	(0,23 a 1,51)	57,59	(45,82 a 78,62)
2,5%	0,71	0,44		0,49	(0,21 a 1,17)	53,00	(33,45 a 68,22)
3,0%	0,62	0,44		0,54	(0,23 a 1,28)	55,29	(35,30 a 69,99)
E. coli							
Intercepto	-0,57	0,46	0,7404				
Tratamentos							
Controle	Referência			Referência		36,08	(20,71 a 54,69)
2,0%	0,38	0,45		1,46	(0,60 a 3,51)	45,11	(31,96 a 66,28)
2,5%	-0,72	0,43		0,93	(0,40 a 2,19)	34,43	(19,70 a 53,43)
3,0%	0,21	0,43		1,23	(0,53 a 2,86)	40,97	(24,43 a 59,51)

Tabela 8: Continuação.

Parâmetros	Coeficiente	EP ¹	Valor P	OR ²	I.C. 95% ³	Ocorrência Ajustada (%) ⁴	I.C. 95% ⁵
BAL (hetero) ⁶							
Intercepto	4,50	1,25					
Tratamentos			0,0544				
Controle	Referência			Referência		98,90 ^a	(86,47 a 99,75)
2,0%	-2,77	1,13		0,06	(0,01 a 0,58)	84,92 ^{ab}	(64,98 a 92,26)
2,5%	-2,55	1,09		0,08	(0,01 a 0,68)	87,51 ^{ab}	(62,85 a 91,75)
3,0%	-2,98	1,09		0,05	(0,01 a 0,43)	82,00 ^b	(54,88 a 87,94)

¹ Erro padrão.² Razão de chances (“odds ratio”) derivada do modelo linear misto generalizado (regressão logística).³ Intervalo de confiança de 95% da razão de chances.⁴ Ocorrência (predição linear marginal) derivada do modelo linear misto generalizado (regressão logística).⁵ Intervalo de confiança de 95% da ocorrência ajustada.⁶ Bactérias ácido-láticas heterofermentativas.

* São significativas as comparações com o número 1 ausente no intervalo de confiança de 95%.

^{a,b,c,d} Valores com letras distintas são diferentes (Valor $P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

Para bactérias ácido-láticas totais e homofermentativas, a ausência de meias carcaças isentas no grupo controle não permitiu a estatística analítica utilizando o modelo linear misto generalizado (regressão logística), conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Ocorrência descritiva dos grupos bacterianos nas meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento

Parâmetros ¹	Frequência Relativa (%)	Intervalo de Confiança (95%)
BAL (total) ²		
Controle	100 (50/50)	(0,93 a 1,00)
2,0%	89,36 (42/47)	(0,77 a 0,97)
2,5%	91,84 (45/49)	(0,80 a 0,98)
3,0%	91,84 (45/49)	(0,80 a 0,98)
BAL (homo) ³		
Controle	100 (50/50)	(0,93 a 1,00)
2,0%	87,23 (41/47)	(0,74 a 0,95)
2,5%	79,59 (39/49)	(0,66 a 0,90)
3,0%	85,71 (42/49)	(0,73 a 0,94)

¹ Estatística descritiva..² Total de bactérias ácido-láticas (homo e heterofermentativas).³ Bactérias ácido-láticas homofermentativas.

Nas condições estabelecidas pelo estudo 02, para todos os grupos bacterianos avaliados foi possível determinar as equações de predição linear, válidas para concentrações de ácido láctico entre 0 e 3%. Considerando somente as amostras com resultado positivo, o tratamento com ácido láctico reduz a contagem de *Escherichia coli* em $0,09 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ ($P = 0,0209$) a cada unidade percentual de ácido láctico utilizada. Com valor $P < 0,0001$, o tratamento com ácido láctico reduz as contagens médias de mesófilos em $0,31 \log_{10} \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$, de psicrotróficos em $0,23 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$, de BALtotal em $0,33 \log_{10} \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$, de BALhetero em $0,25 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ e de BALhomo em $0,32 \log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ a cada unidade percentual de ácido láctico utilizada (Tabela 10).

Tabela 10 - Equação linear para predição da contagem em $\log_{10} \text{ UFC/cm}^2$ de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com solução de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento

Parâmetros	Intercepto ¹	EP ²	I.C. 95% ³	Coefficiente Angular ⁴	EP ⁵	I.C. 95% ⁶	Valor P
Enterobactérias	-0,22	0,16	(-0,67 a 0,24)	-0,12	0,03	(-0,19 a -0,05)	0,0005
<i>E. coli</i> (positivos) ⁷	-0,54	0,11	(-0,79 a -0,29)	-0,09	0,04	(-0,16 a -0,01)	0,0209
Mesófilos	1,57	0,13	(1,24 a 1,90)	-0,31	0,03	(-0,38 a -0,25)	<0,0001
Psicrotróficos	1,20	0,15	(0,80 a 1,61)	-0,23	0,03	(-0,30 a -0,17)	<0,0001
BAL (total) ⁸	0,69	0,13	(0,33 a 1,05)	-0,33	0,03	(-0,39 a -0,27)	<0,0001
BAL (hetero) ⁹	0,23	0,14	(-0,16 a 0,62)	-0,25	0,03	(-0,30 a -0,19)	<0,0001
BAL (homo) ¹⁰	0,44	0,13	(0,09 a 0,80)	-0,32	0,03	(-0,37 a -0,26)	<0,0001

¹ Intercepto da equação obtida por modelo linear misto (regressão linear múltipla). Este valor representa a **contagem inicial do grupo bacteriano na meia-carcaça sem tratamento com ácido láctico**.

² Erro padrão do intercepto da equação.

³ Intervalo de confiança de 95% do intercepto da equação.

⁴ Coeficiente angular da equação obtida por modelo linear misto (regressão linear múltipla). Este valor representa a **taxa de redução do grupo bacteriano por percentual de ácido láctico (concentração)** utilizado para tratar as meias carcaças, ou seja, a **eficiência do ácido láctico**. Equação estatisticamente válida para concentrações entre 0 e 3% de ácido láctico.

⁵ Erro padrão do coeficiente angular da equação.

⁶ Intervalo de confiança de 95% do coeficiente angular da equação.

⁷ Análise estatística considerando somente os resultados positivos (acima do limite de detecção analítico).

⁸ Todas as bactérias ácido-láticas (homo e heterofermentativas).

⁹ Bactérias ácido-láticas heterofermentativas.

¹⁰ Bactérias ácido-láticas homofermentativas.

A contagem média de enterobactérias em carcaças tratadas com 2,5% (-0,58 $\log_{10} \text{ UFC/cm}^2$) e 3,0% de ácido láctico (-0,54 $\log_{10} \text{ UFC/cm}^2$) foram menores ($P = 0,0048$) que no grupo controle (-0,21 $\log_{10} \text{ UFC/cm}^2$). Com valor $P < 0,0001$, as contagens médias de mesófilos, psicrotróficos, BALtotal, BALhetero e BALhomo em todas as carcaças tratadas (2,0, 2,5 e 3,0%) com solução de ácido láctico foram menores que nos respectivos grupos controle (Tabela 11).

Tabela 11 - Média de contagem em $\log_{10}$ UFC/cm² de grupos bacterianos na superfície de meias carcaças bovinas tratadas com soluções de ácido láctico e avaliadas antes do resfriamento

Parâmetros	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor P
	Controle	2,0%	2,5%	3,0%		
Enterobactérias						
Todos ³	-0,21 ^a	-0,44 ^{ab}	-0,58 ^b	-0,54 ^b	0,17	0,0048
Positivos ⁴	-0,22	-0,25	-0,44	-0,33	0,16	0,4005
Coliformes						
Todos ³	-0,59	-0,62	-0,71	-0,68	0,12	0,4825
Positivos ⁴	-0,50	-0,41	-0,54	-0,51	0,06	0,7567
<i>E. coli</i>						
Todos ³	-0,82	-0,79	-0,90	-0,91	0,08	0,1914
Positivos ⁴	-0,58	-0,58	-0,82	-0,85	0,11	0,0278*
Mesófilos	1,60 ^a	0,88 ^b	0,72 ^b	0,72 ^b	0,13	< 0,0001
Psicrotróficos	1,20 ^a	0,72 ^b	0,67 ^b	0,47 ^b	0,16	< 0,0001
BAL (total) ⁵	0,72 ^a	-0,04 ^b	-0,19 ^b	-0,23 ^b	0,14	< 0,0001
BAL (hetero) ⁶	0,25 ^a	-0,31 ^b	-0,43 ^b	-0,46 ^b	0,14	< 0,0001
BAL (homo) ⁷	0,46 ^a	-0,21 ^b	-0,39 ^b	-0,45 ^b	0,13	< 0,0001

¹ Média dos quadrados mínimos obtida por modelo linear misto (análise de variância).

² Erro padrão médio.

³ Análise estatística considerando todos os resultados. Para os resultados negativos foi adotado o valor do limite de detecção analítico de $-1,08 \log_{10}$ UFC/cm².

⁴ Análise estatística considerando somente os resultados positivos (acima do limite de detecção analítico).

⁵ Todas as bactérias ácido-láticas (homo e heterofermentativas).

⁶ Bactérias ácido-láticas heterofermentativas.

⁷ Bactérias ácido-láticas homofermentativas.

^{a,b,c,d} Valores com letras distintas na mesma linha são diferentes (Valor $P < 0,05$), considerando o teste de Tukey-Kramer.

* Valor $P > 0,05$ em todas as comparações múltiplas, considerando o teste de Tukey-Kramer.

E. coli STEC e EPEC

Todas as amostragens de carcaça situaram-se abaixo do limite de detecção da qPCR ($< 0,35 \log$ cópias/cm²) para STEC (*stx*₁ e *stx*₂) e EPEC (*eae*).

3.2 Avaliação da cor instrumental

A avaliação da cor objetiva da gordura de cobertura demonstrou que a luminosidade (L^*) na região da picanha, ou seja, a cor branca foi maior nas carcaças aspergidas independente da concentração utilizada ($P < 0,05$). Não foram detectadas diferenças estatísticas para este parâmetro na região da paleta (Figura 03).

Ainda, a intensidade de vermelho (a^*) diminuiu com a aspersão do ácido láctico. Para a região da paleta, a intensidade do vermelho foi menor nos tratamentos de 2,5 e 3% de ácido láctico. Já para região da picanha, a aspersão da solução de 2% de ácido láctico diminuiu a intensidade de vermelho, a qual foi reduzida gradativamente, sendo

que a aspersão de 3% de ácido láctico apresentou menor valor para este parâmetro ($P < 0,05$), conforme Figura 04.

O parâmetro b^* não diferiu estatisticamente entre os tratamentos para as duas regiões avaliadas (Figura 05).

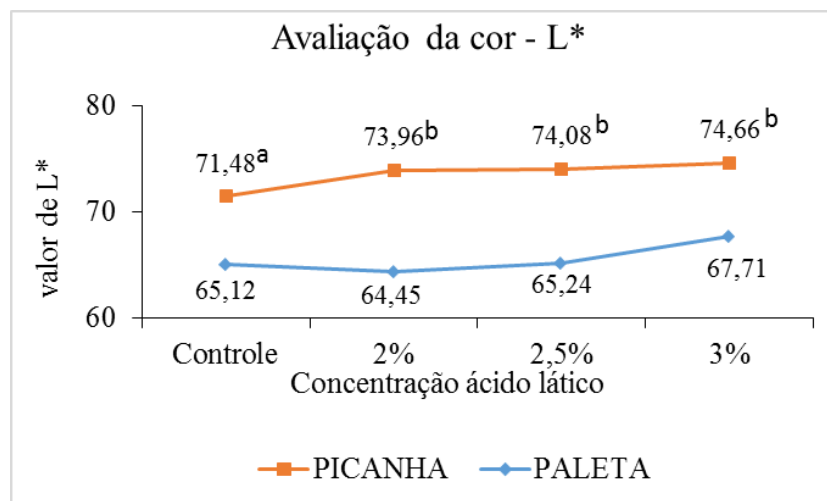


Figura 03- Valor do parâmetro de Luminosidade (L), com Intervalo de Confiança (95%), para a gordura de cobertura da região da paleta e da picanha da superfície das carcaças aspergidas com diferentes concentrações de ácido láctico.

^{a,b} Valores com letras distintas para a mesma região da carcaça são diferentes ($P < 0,05$).

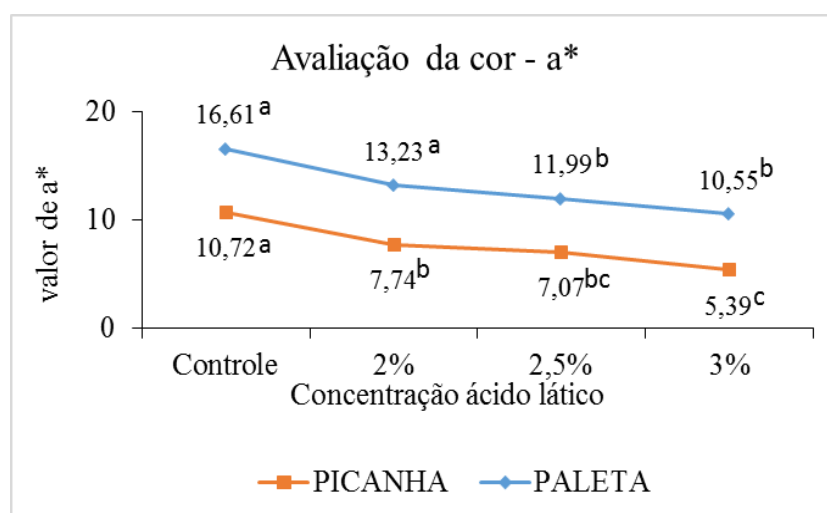


Figura 04 – Valor do parâmetro de intensidade do vermelho (a^*), com Intervalo de Confiança (95%), para região da paleta e da picanha da superfície das carcaças aspergidas com diferentes concentrações de ácido láctico.

^{a,b,c} Valores com letras distintas para a mesma região da carcaça são diferentes ($P < 0,05$).

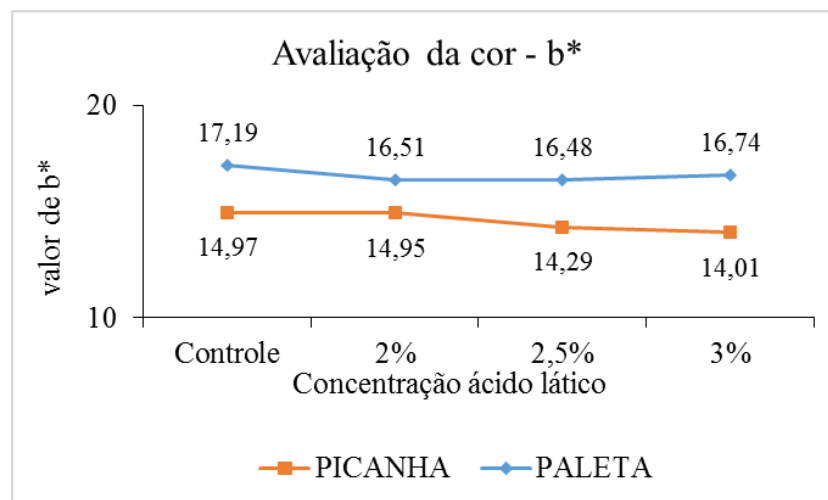


Figura 05 - Valor do parâmetro de intensidade de amarelo (b^*), com Intervalo de Confiança (95%), para região da paleta e da picanha da superfície das carcaças aspergidas com diferentes concentrações de ácido láctico.

4 DISCUSSÃO

A descontaminação de carcaças no abate é considerada uma medida de controle importante que pode aumentar a segurança do alimento e reduzir o risco microbiológico para os consumidores. Dentro deste conceito, a aspersão de ácido láctico pode representar uma das intervenções tecnológicas utilizadas para tratamento das carcaças bovinas.

A partir da análise global (estudo 01 e estudo 02) foi possível detectar que o tratamento com ácido láctico reduz a contagem média de enterobactérias, coliformes, mesófilos e bactérias ácido-láticas. Para *E. coli* foi obtida taxa de redução com tendência estatística. Apesar da temperatura e do volume das soluções de ácido láctico serem diferentes entre os dois estudos, os resultados da análise global sugerem que a administração de ácido láctico é eficiente na redução da contagem microbiana antes do resfriamento. As taxas de redução são estatisticamente válidas para as condições estabelecidas por estes estudos: concentração de ácido láctico entre 0 e 3%; uso do boxe de aspersão; temperatura da solução de 33 ou 55°C; volume utilizado em cada meia carcaça de 1,6 ou 4,2 litros; e avaliação (amostragem) das meias carcaças após 30 minutos da aplicação da solução.

Os baixos valores P derivados dos modelos mistos de regressão linear para enterobactérias, mesófilos e BAL na análise global ($P < 0,0001$), corroboram com os resultados do estudo 01 (mesófilos, $P < 0,0001$; e BAL $P = 0,0008$) e do estudo 02 (enterobactérias, $P = 0,0001$; mesófilos, $P < 0,0001$; e BALtotal, $P < 0,0001$). Ademais, a tendência estatística observada para *Escherichia coli* na análise global ($P = 0,0524$), assemelha-se a significância reportada no estudo 02 ($P = 0,0209$). A diferença na conclusão dos resultados deve-se apenas a significância observada para os coliformes na análise global ($P = 0,0427$) quando comparado aos estudos analisados de forma individual ($P > 0,05$), o que pode estar relacionado ao maior tamanho amostral da análise global e consequente maior poder estatístico.

No estudo 01 foram testadas todas as possíveis interações entre os efeitos tratamento e momento (antes e após o resfriamento) para todos os grupos bacterianos, e em todos os casos, não houve interação estatisticamente significativa. Portanto o processo de resfriamento não afetou o comportamento do ácido láctico na redução das contagens bacterianas, conforme também verificado por Dormedy et al. (2000), que avaliando a aspersão de 2% de ácido láctico em carcaças, observaram redução no número de bactérias mesófilas, psicrotróficas, coliformes, *E. coli* e bactérias ácido-láticas, logo após o tratamento e que se manteve após 24 horas de resfriamento. Na presente pesquisa, considerando a aspersão de ácido láctico em até 2%, o efeito injuriante do frio e da dessecação da superfície das carcaças durante o resfriamento foi mais importante na redução das contagens bacterianas do que os próprios tratamentos.

Ainda considerando o estudo 01, foram aspergidas diferentes concentrações de ácido láctico em carcaças bovinas, em temperatura ambiente (aproximadamente 33°C), com efeito na redução de ocorrência de coliformes antes do resfriamento e bactérias ácido-láticas após o resfriamento. As contagens médias foram reduzidas apenas para mesófilos e bactérias ácido-láticas. Castilho (1998) observou que em temperaturas superiores (50 a 55°C) os ácidos orgânicos são mais eficazes. Ademais, foi relatado que o grau da descontaminação é aumentado por concentrações de ácido láctico superiores a 2% na solução aplicada (STOPFORTH et al., 2005). Portanto, estes dois fatores associados podem explicar a baixa eficiência na redução dos grupos bacterianos avaliados nesta fase da pesquisa.

No estudo 02, em que foram utilizadas concentrações de ácido láctico superiores ao estudo 01 e o acréscimo da temperatura, foi observado redução na ocorrência de enterobactérias e bactérias ácido-láticas heterofermentativas, além da diminuição na contagem média em todos os grupos bacterianos avaliados, com exceção de coliformes e *E. coli*. Russell (1992) levantou a hipótese de que alguns

microrganismos são mais resistentes aos ácidos orgânicos porque são capazes de permitir que seu pH interno diminua. Assim, concentrações maiores de ácido láctico podem ser mais efetivas para estes grupos, do que aquelas utilizadas nesta pesquisa.

A eficácia dos ácidos orgânicos está relacionada com a concentração, pH, pKa e a concentração da molécula não dissociada (BAIRD, 1987). Ainda, a gordura e a superfície irregular da carcaça podem atuar como proteção aos microrganismos. Também, a presença de quantidades excessivas de matéria orgânica pode modificar os efeitos dos ácidos orgânicos sobre os microrganismos (BUCHANAN et al., 1993).

O tratamento de superfícies de carne bovina com 5% de ácido láctico resultou em maior eficácia quando inoculado maior nível de *E. coli* do que com o nível mais baixo (YOUSSEF, et al. 2012). No presente estudo, as contagens de *E. coli*, enterobactérias e coliformes totais, foram baixas, de modo que o efeito da redução ocasionada pela aspersão do ácido láctico não foi expressivo ou até mesmo ausente, conforme também observado por outros autores (PIPEK, et al. 2005; RODRÍGUEZ-MELCÓN, et al. 2017).

Apesar de estudos demonstrarem a ação do ácido láctico na redução da contagem de *E. coli* (CASTILLO et al., 2001; BARBOZA de MARTINEZ et al., 2002), nesta pesquisa, este efeito não foi observado. A comunidade científica tem verificado menor eficácia do ácido láctico para *E. coli* em relação aos demais grupos microbianos, devido à aspectos relacionados à ácido-resistência (WANG et al., 2014; YOUSSEF et al., 2012). Ainda, a tendência estatística para um determinado parâmetro geralmente sugere a necessidade de maior tamanho amostral para a correta avaliação do mesmo, possivelmente devido a sua maior variabilidade (PAGANO; GAUVREAU, 2012).

As análises por qPCR de *E. coli* obtidas nas amostras de carcaças positivas deste estudo, não detectou a ocorrência de *E. coli* STEC e EPEC. O Petrifilm EC, utilizado na presente pesquisa, seleciona somente *E. coli* beta-glucuronidase positiva, o que pode ter prejudicado a detecção de STEC e EPEC.

Entre as limitações do uso dos ácidos orgânicos, estão as possíveis descoloração da carne e alterações sensoriais (WHEELER, et al., 2014). De maneira geral, a aplicação de ácido láctico neste estudo afetou a coloração da gordura de cobertura das carcaças e locais com concentração de sangue. Visualmente, quanto maior a concentração utilizada, os efeitos se tornam mais pronunciados.

A avaliação da cor objetiva da gordura de cobertura demonstrou que a luminosidade (L^*) na região da picanha, ou seja, a cor branca foi maior nas carcaças aspergidas independente da concentração utilizada, corroborando com pesquisas já realizadas (FRIEDERICH et al., 2008; JIMÉNEZ-VILLARREAL et al., 2003; KOTULA e THELAPPURATE, 1994; NAVEENA et al., 2006; STIVARIOUS, et al., 2002). A

gordura de cobertura, em sua maioria escassa, nas carcaças bovinas brasileiras, não permite o procedimento de refile adotado em outros países, em que as carcaças apresentam maior cobertura de gordura. Este fator implica ao Brasil uma condição diferenciada para o uso do ácido láctico, em que os protocolos de aspersão devem considerar as alterações na coloração das carcaças.

Não foram detectadas diferenças estatísticas para a luminosidade (L^*) na região da paleta, o que pode ter ocorrido devido à desuniformidade desta região, que apresenta pouca cobertura de gordura e possui o carimbo do Serviço da Inspeção Federal.

Ainda, a intensidade de vermelho (a^*) diminuiu com a aspersão do ácido láctico, ou seja, a cor tendeu ao cinza. Este parâmetro é provavelmente um dos mais importantes para cor da carne fresca (RODRÍGUEZ-MELCÓN, 2017), pois pode remeter ao tempo que esta carne está acondicionada. A redução no valor da intensidade do vermelho também foi relatada por outros autores (FRIEDERICH et al., 2008; JIMÉNEZ-VILLAREAL et al., 2003; NAVEENA et al., 2006, RODRÍGUEZ-MELCÓN, 2017).

O parâmetro b^* não diferiu estatisticamente entre os tratamentos para as duas regiões avaliadas, ou seja, a intensidade de amarelo não foi alterada pela aspersão das diferentes soluções de ácido láctico ($P < 0,05$), diferente do que já foi relatado em demais pesquisas (NAVEENA et al., 2006; RODRÍGUEZ-MELCÓN, 2017).

De maneira geral, a coloração mais escura das manchas de sangue presentes nas carcaças pode ocorrer devido à oxidação do ferro ligado ao grupo heme da hemoglobina, resultando na formação de metahemoglobina.

A descoloração é o principal problema associado à descontaminação da carne com ácidos orgânicos, em níveis mais elevados. Melhorar a estabilidade da cor é a preocupação para a indústria de carne, visto que a cor é o principal atributo de qualidade que afeta as decisões dos consumidores no momento da compra (CANTO et al., 2016). Por esta razão, quaisquer possíveis impactos do tratamento de descontaminação sobre a cor da superfície devem ser considerados.

Portanto, com base nos resultados e no valor biológico dos mesmos, foi possível verificar que os estudos supracitados (estudos 01 e 02), realizados considerando a realidade produtiva nacional, corroboram com a literatura internacional existente (GREIG et al., 2012; PITTMAN et al., 2012; RODRÍGUEZ-MELCÓN et al., 2017; WHEELER et al., 2014; YOUSSEF et al., 2012) e com as especificações da União Europeia (CE, 2013) e dos Estados Unidos (USDA, 2017), no que diz respeito ao tratamento antimicrobiano de carcaças bovinas com concentrações a partir de 2,0% de ácido láctico em água potável.

5. CONCLUSÃO

O tratamento de carcaças bovinas com solução de ácido láctico utilizando boxe de aspersão é eficiente na redução de ocorrências e contagens de enterobactérias, coliformes e bactérias ácido-láticas, assim como, de contagens de mesófilos e psicrotróficos. Também foi observado redução de ocorrências e contagens de *E. coli*, entretanto, de um modo geral, com tendência estatística, o que também pode representar e repercutir em melhorias reais para as indústrias e para cadeia produtiva da carne.

A aspersão de qualquer concentração de ácido láctico implica em alterações na coloração e no aspecto da cobertura de gordura das carcaças, sendo que, os efeitos negativos se tornam mais pronunciados conforme a concentração do ácido láctico é aumentada.

Considerando o aspecto visual das carcaças e a redução da contagem bacteriana obtida neste estudo, recomenda-se o uso da aspersão de solução de ácido láctico a partir 2%, para tratamento antimicrobiano de carcaças bovinas *Bos indicus*.

6. REFERÊNCIAS

- AMSA. Meat Color Measurement Guidelines – Revised December, 2012. **American Meat Science Association**. Champaign, IL, USA, 136p, 2012.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. Official Method 2003.01., 19.ed., Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2012a.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. Official Method 991.14. 19 ed., Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2012b.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. Official Method 998.08, 19.ed., Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2012c.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL**. Official Method 990.12., 19.ed., Gaithersburg: AOAC INTERNATIONAL, 2012d.
- APPLEYARD, R. K. Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. **Genetics**, v. 39, n. 4, p. 440, 1954.
- APHA - American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, 676p, 2001.
- ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; NOU, X.; et al. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, Enterobacteriaceae, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. **Journal of Food Protection**, v.67, n.4, p.658-665, 2004.
- ARTHUR, T.M.; KALCHAYANAND, N.; BOSILEVAC, J.M.; et al. Comparison of effects of antimicrobial interventions on multidrug-resistant *Salmonella*, susceptible

Salmonella, and Escherichia coli O157:H7. **Journal of Food Protection**, v.71, n.11, p. 2168-2181, 2008.

BAIRD, R.M.; CORRY, J.E.L.; CURTIS, G.D.W. Pharmacopoeia of culture media for food microbiology. **International Journal of Food Microbiology**, v.5, n.3, p.221–222, 1987.

BARBOZA DE MARTINEZ, Y.; FERRER, K.; SALAS, E.M. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 4, n.11, p.1687–1829, 2002.

BELLIN, T.; PULZ, M.; MATUSSEK, A.; HEMPEN, H.G.; GUNZER, F. Rapid detection of enterohemorrhagic escherichia coliby real-time pcr with fluorescent hybridization probes. **Journal of clinical microbiology**, v.39, n.1, p.370-374, 2001.

BOSILEVAC, J.M.; NOU, X.; BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; et al. Treatments Using Hot Water Instead of Lactic Acid Reduce Levels of Aerobic Bacteria and Enterobacteriaceae and Reduce the Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 on Preevisceration Beef Carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 69, n.8, p.1808–1813, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 2003.

BUCHANAN, R.L.; GOLDEN, M.H.; WHITING, R.C. Differentiation of the Effects of pH and Lactic or Acetic Acid Concentration on the Kinetics of *Listeria Monocytogenes* Inactivation. **Journal of Food Protection**, v.56, n.6, p.474-478, 1993.

BUNCIC, S.; NYCHAS, G.; LEE, M.R.F.; et al. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. **Meat Science**, v.97, p.288-297, 2014.

CALLAWAY, T.R.; CARR, M.A.; EDRINGTON, T.S.; et al. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: A review after 10 years. **Current Issues in Molecular Biology**, v.11, p.67-80, 2009.

CANTO, A.C.V.C.S.; COSTA-LIMA, B.R.C.; SUMAN, S.P.; et al. Colour attributes and oxidative stability of longissimus lumborum and psoas major muscles from Nellore bulls. **Meat Science**, v.121, p.19-26, 2016.

CASTILLO, A.; LUCIA, L.M.; GOODSON, K.J.; et al. Comparison of Water Wash, Trimming, and Combined Hot Water and Lactic Acid Treatments for Reducing Bacteria of Fecal Origin on Beef Carcasses. **Journal of Food Protection**: v.61, n.7, p.823-828, 1998.

CASTILLO, A.; LUCIA, L.M.; ROBERTSON, D.B.; et al. Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef. **Journal of Food Protection**, v.64, n.1, p.58-62, 2001.

CDC-HHS. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). U.S. Department of Health & Human Services (HHS). **E.coli Homepage. General Information**. Page last updated: November 6, 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

CRUZ, T.F.; ARAUJO, J.P. Cultivation of PCV2 in swine testicle cells using the shell vial technique and monitoring of viral replication by qPCR and RT-qPCR. **Journal of virological methods**, v.196, p.82-85, 2014.

DAVIES, M.; HADLEY, P.; STOSIC, P.; et al. Production factors that influence the hygienic condition of finished beef cattle. **The Veterinary Record**, v.146, n.7, p.179–183, 2000.

DORMEDY, E., BRASHEARS, M., CUTTER, N., Y BURSON, E. Validation of acid washes as critical control points in hazard analysis and critical control points systems. **Journal of food protection**, v.63, n.12, p.1676-1680, 2000.

DUFFY, G.; BURGESS, C.M.; BOLTON, D.J. A review of factors that effect transmission and survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in the European farm to fork beef chain. **Meat Science**, v.97, p.375-383, 2014.

EFSA. **European Food Safety Authority**. Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (bovine animals). **EFSA Journal** 2013, v.11, n.6, 261p, 2013b.

EFSA. **European Food Safety Authority**. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA Journal** 2013, v.11, n.4, 250p, 2013a.

EFSA. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. **EFSA Journal**, v.9, n.7, p.2317-2351, 2011.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. FSIS DIRECTIVE – Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products, 7120.1 Rev.21, de 9 de Outubro de 2014. **United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service**, Washington D.C., 69p, 2014.

FENG, P.; WEAGANT, S.D.; JINNEMAN, K. Chapter 4A - Diarrheagenic *Escherichia coli*, Updated June 2016. **FDA Bacteriological Analytical Manual Online (BAM)**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>>. Acesso em: 27 out. 2016.

FERRAZ, J.B.S.; FELÍCIO, P.E. Production systems—An example from Brazil. **Meat science**, v.84, n.2, p.238-243, 2010.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed. 424p, 2002.

FOULADKHAH, A.; GEORNARAS, I.; YANG, H.; et al. Lactic acid resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Newport* in meat homogenate. **Food Microbiology**, v.36, n.2, p.260-266, 2013.

FRIEDERICH, L.; SIRÓ, I.; DALMADI, I.; et al. Influence of various preservatives on the quality of minced beef under modified atmosphere at chilled storage. **Meat Science**, v.79, n.2, p.332-343, 2008.

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

GREIG, J.D.; WADDELL, L.; WIHELM, B.; WILKINS, W.; BUCHER, O.; PARKER, S.; RAJIC, A. The efficacy of interventions applied during primary processing on contamination of beef carcasses with *Escherichia coli*: A systematic review-meta-analysis of the published research. **Food Control**, v. 27, n. 2, p. 385-397, 2012.

HARDEGEN, C.; MESSLER, S.; HENRICH, B.; et al. A set of novel multiplex Taqman real-time PCRs for the detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* and its use in determining the prevalence of EPEC and EAEC in a university hospital. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v.9, n.1, p.1, 2010.

HARRIS, K.; MILLER, M.F.; LONERAGAN, G.H.; et al. Validation of the use of organic acids and acidified sodium chlorite to reduce *Escherichia coli* O157 and *Salmonella Typhimurium* in beef trim and ground beef in a simulated processing environment. **Journal of Food Protection**, v.69, n.8, p.1802-1807, 2006.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **(ISO) 17604:2015(E)**. Microbiology of food and animal feeding stuffs – carcass sampling for microbiological analysis. Switzerland, 14p, 2015.

JIMÉNEZ-VILLAREAL, J.R.; POHLMAN, F.W.; JOHNSON, Z.B., et al. Effects of chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride, lactic acid and trisodium phosphate on physical, chemical and sensory properties of ground beef. **Meat Science**, v.65, n.3, p.1055-1062, 2003.

KOTULA, K.L.; THELAPPURATE, R. Microbiological and sensory attributes of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solutions. **Journal of Food Protection**, v.57, n.8, p.665-670, 1994.

LADEKJÆR-MIKKELSEN, A.S.; NIELSEN, J.; STADEJEK, T.; et al. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). **Veterinary microbiology**, v.89, n.2, p.97-114, 2002.

NAVEENA, B.M.; MUTHUKUMAR, M.; SEN, A.R.; et al. Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. **Meat Science**, v.74, n.2, p.409-415, 2006.

ORTOLANI, M.B.T.; VIÇOSA, G.N.; BELOTI, V.; et al. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in Petrifilm™ Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. **Journal of Dairy Research**, v.74, p.387–391, 2007.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G.F.; EVANS, P.S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H.A.; POÂ SFAI. G.R.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E.J.; DAVIS, N.W.; LIMK, A.; DIMALANTAK, E.T.; POTAMOUSIS, K.D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T.A.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D.C.; WELCHI, R.A.; PÓSFAI, G. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, n. 6819, p. 529-533, 2001.

PIPEK, P.; HOUŠKA, M.; JELENÍKOVÁ, J.; et al. Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray. **Journal of Food Engineering**, v.67, n.3, p.309-315, 2005.

PITTMAN, C.I.; GEORNARAS, I.; WORENER, D.R.; et al. Evaluation of lactic acid as an initial and secondary subprimal intervention for *Escherichia coli* O157:H7, non-O157 shiga toxineproducing *E. coli*, and a nonpathogenic *E. coli* surrogate for *E. coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, v.75, n.9, p.1701-1708, 2012.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, p.681-685, 1983.

RODRÍGUEZ-MELCÓN, C.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R. Lactic acid concentrations that reduce microbial load yet minimally impact colour and sensory characteristics of beef. **Meat Science**. v.129, p.169–175, 2017.

RUSSELL, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, n.5, p.363-370, 1992.

SCHWACH, E. **Validação do sistema de monitoramento para redução da contaminação microbiana em carcaças bovinas**. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2007.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. **Journal of bacteriology**, v.189, n.23, p.8746-8749, 2007.

SPERBER, W.H. Introduction to the microbial spoilage of foods and beverages. In: SPERBER, W.H.; DOYLE, M.P. **Compendium of the microbial spoilage of foods and beverages**. New York: Springer, p.1–40, 2010.

STIVARIOUS, M.R.; POHLMAN, F.W.; MCELYEA, K.S.; et al. Effects of hot water and lactic acid treatment of beef trimmings prior to grinding on microbial, instrumental colour and sensory properties of ground beef during display. **Meat Science**, v.60, n.4, p.327-334, 2002.

STOPFORTH, J.D.; ASHTON, L.V.; SKANDAMIS, P.N.; et al. Single and sequential treatment of beef tissue with lactic acid, ammonium hydroxide, sodium metasilicate, and acidic and basic oxidized water to reduce numbers of inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium*. **Food Protection Trends**, v.25, p.14-22, 2005.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (UE) N° 101/2013 da Comissão, de 4 de fevereiro de 2013. Relativo à utilização do ácido láctico para reduzir a contaminação superficial microbiológica das carcaças de bovinos. **Jornal Oficial da União Europeia**, p. L34/1-L34/2, 5 de fev. de 2013.

USDA-FSIS. U.S. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service (FSIS). Pathogen Reduction; Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) Systems; Final Rule. **Federal Register**, Washington, DC, v.144, n.61, p.388-405, 1996.

United States Department of Agriculture (USDA), Food Safety and Inspection Service (FSIS). FSIS DIRECTIVE No. 7120.1. Rev.21, 10/5/17. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products. **Federal Register** , Washington, DC, 123p, 2017.

WANG, H.; COLIN, O.; GILL, X.Y. Development of a real-time PCR procedure for quantification of viable *Escherichia coli* in populations of *E. coli* exposed to lactic acid, and the acid tolerance of verotoxigenic *E. coli* (VTEC) from cattle hides. **Food Control**, v.43, p.104-109, 2014.

WHEELER, T.L.; KALCHAYANAND, N.; BOSILEVAC, J.M. Pre- and post-harvest interventions to reduce pathogen contamination in the U.S. beef industry. **Meat Science**, v.98, p.372–382, 2014.

YOSHITOMI, K.J.; JINNEMAN, K.C.; WEAGANT, S.D. Detection of Shiga toxin genes *stx1*, *stx2*, and the + 93 *uidA* mutation of *E. coli* O157: H7/H-using SYBR® Green I in a real-time multiplex PCR. **Molecular and cellular probes**, v.20, n.1, p.31-41, 2006.

YOUSSEF, M.K.; YANG, X.; BADONI, M.; et al. Effects of spray volume, type of surface tissue and inoculum level on the survival of *Escherichia coli* on beef sprayed with 5% lactic acid. **Food Control**, v.25, n.2, p.717-722, 2012.

CAPÍTULO 3

IMPLICAÇÕES

A indústria de alimentos, em especial a de carnes, pode ser acometida por prejuízos decorrentes da contaminação bacteriana em seus produtos, sejam eles financeiros, que estão relacionados à deterioração destes produtos, redução da validade comercial ou devoluções. Porém, com maior destaque, estão os problemas relacionados à saúde pública. Sendo assim, todas as técnicas que contribuam na cadeia de produção de alimentos para manutenção da qualidade microbiana, merecem destaque.

Neste sentido, o uso de ácido láctico, alvo deste estudo, poderia contribuir para estender a validade comercial das carnes e evitar riscos à saúde pública. A presente pesquisa, inédita no Brasil, avaliou como este produto utilizado amplamente em diversos países pode contribuir na redução da contaminação de carcaças, considerando a realidade nacional de nosso rebanho e de abate. Muitas das pesquisas executadas em outros países, não se aplicam às condições brasileiras. Neste estudo, foi possível determinar um protocolo de aplicação de ácido láctico adequado para a realidade nacional.

Tão importante quanto seus efeitos na redução microbiana, as implicações nas características sensoriais da carne e da carcaça devem ser consideradas no uso de procedimentos de descontaminação. As alterações da cor da carne continuam sendo um grande problema no uso destas técnicas e é uma grande preocupação para toda cadeia da carne, visto ser este dos principais atributos considerados pelo consumidor como critério de escolha de compra. Estes impactos devem ser considerados e técnicas de descontaminação com ácido láctico devem ser avaliadas e aprimoradas, objetivando a redução da carga bacteriana, associando a manutenção dos atributos sensoriais, de modo a contribuir com a melhoria da indústria da carne e da saúde pública.