

NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE *SALMONELLA* SP. EM FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL

Marion Ruis¹, Rosângela Uhrig Salvatori², Cláudia Majolo³, Tainá Drebes⁴

Resumo: As farinhas de origem animal são excelentes fontes proteicas para o desenvolvimento do animal. No entanto, são suscetíveis à contaminação por micro-organismos, destacando-se o gênero patogênico *Salmonella*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar uma metodologia empregando a técnica do NMP na quantificação de *Salmonella* sp. e determinar o limite de detecção (LD). Foram utilizadas 20 amostras de farinhas de origem animal para a avaliação da contagem de *Salmonella* sp. Foi possível quantificar a presença de *Salmonella* sp. em 16 amostras, resultando em 80% do total avaliado, com variação de 0,3 NMP/g a >110 NMP/g. Os resultados de LD (0,23 UFC/g, 5,7 UFC/25 g) comprovam a elevada sensibilidade do método. O LD determinado comparável ao mínimo detectável expresso na tabela de NMP/g confere coerência aos resultados - LD de 0,23 está muito próximo do mínimo de 0,3 NMP/g.

Palavras-chave: *Salmonella*. Farinha de origem animal. Número mais provável.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de ração do mercado latino-americano. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES, 2012), foram produzidas 31,4 milhões de toneladas de ração no primeiro semestre de 2011.

Devido ao aumento significativo de produção, a indústria de rações depara-se com a necessidade de grandes volumes de ingredientes. Em consequência disso, ocorre, com frequência, escassez de insumos alternativos ao milho e ao farelo de soja, que são a principal matéria-prima para a produção de ração. Por esse motivo, é necessária a busca por substitutos alternativos (BELLAYER, 2001a).

No Brasil, são gerados milhões de toneladas de resíduos animais não comestíveis, oriundos de abatedouros. Eles são ingredientes alternativos, com excelente fonte proteica, utilizados na fabricação de farinhas de origem animal pela indústria de rações. Essa aplicação contribui para a manutenção de um ambiente mais limpo e na geração de um valor agregado significativo, ultrapassando os R\$ 2 bilhões ao ano, incluindo, além da produção de rações, outras aplicações, como fábrica de sabões, couro, tintas, entre outras (BELLAYER; ZANOTTO, 2004).

As farinhas de origem animal propiciam dietas com níveis nutricionais mais elevados, sendo uma opção para suprir a deficiência de alguns aminoácidos nos farelos de origem vegetal (MAZUTTI; TREICHEL; DI LUCCIO, 2008).

1 Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Univates.

2 Professora do curso de Ciências Biológicas da Univates.

3 Colaboradora, EMBRAPA Amazônia Ocidental.

4 Colaboradora, Laboratório Unianálises da Univates.

O processo básico de produção de farinhas animais ocorre na retirada da umidade, trituração dos resíduos não comestíveis de animais e digestão com ou sem pressão. A gordura restante é drenada e o resíduo sólido é moído na forma de farinha. O processamento deve ser realizado em até 24 horas após o abate, para evitar a putrefação e oxidação das gorduras (BRASIL, 2008).

Para a fabricação de uma ração de alta qualidade, é necessário utilizar ingredientes livres de contaminantes. A qualidade da ração é uma medida de controle da veiculação de patógenos, já que é parte integrante da cadeia alimentar, estendendo-se do sistema de produção animal até o consumidor (BELLAVAR, 2001b).

As características das farinhas de origem animal, devido à sua constituição, fazem-na suscetível à deterioração por micro-organismos patogênicos quando não tratadas convenientemente. Esse subproduto encontra-se frequentemente contaminado por patógenos, destacando-se o gênero *Salmonella*, tornando a ração um problema crucial na introdução das salmonelas (ALBUQUERQUE; ITO; MIYAJI, 1999).

O gênero *Salmonella* é amplamente distribuído na natureza, apresentando variabilidade de resistência às condições ambientais, sendo capaz de infectar diferentes espécies animais, entre elas o homem (NETO; VOLPI; REIS, 2003). As salmonelas pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são Gram negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos e com forma de bastonetes curtos. A temperatura ótima de crescimento é 37 °C, sendo a mínima de 5 °C e a máxima de 47 °C. São bactérias termossensíveis, podendo ser destruídas se expostas entre 15 a 20 minutos a 60 °C (FORSYTHE, 2002).

Para atender os padrões higiênicos sanitários, as farinhas de vísceras, penas e carne devem apresentar ausência de bactérias patogênicas, assim, *Salmonella* sp. deve estar ausente em 25 g da amostra considerada (BRASIL, 2008). No caso do processamento de farinhas animais, as altas temperaturas no momento do processamento do produto eliminam em grande parte, se não toda, a contaminação bacteriana. O grande problema ocorre devido à recontaminação das farinhas no momento do manejo, transporte e outros fatores ambientais (JAY, 2005).

O controle microbiológico em matérias-primas das rações destinadas à nutrição animal é de grande importância, visto que a ingestão da ração contaminada por *Salmonella* sp. contribui para toxinfecções nos consumidores de carne e derivados (SANTOS et al., 2000). Entretanto, existe uma quantidade mínima necessária do micro-organismo para a ocorrência de doença. Essa dose infectante pode variar em função do organismo, do sorotipo e do tipo de alimento. Em geral, a dose infectante varia entre 10^5 e 10^9 células/g (JAY, 2005).

Rotineiramente, nos laboratórios, somente é pesquisada a presença de *Salmonella* sp., não levando em consideração a quantidade do patógeno no alimento (SPRICIGO et al., 2008). O método qualitativo não pode ser utilizado para estimar o nível de contaminação do produto, pois, para estabelecer estratégias de controle, é necessário quantificar o perigo. No caso de micro-organismos, significa determinar o número presente no alimento analisado (ESCARTIN et al., 1995).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a metodologia empregando a técnica do Número Mais Provável aplicável em rotina sensível à quantificação de *Salmonella* sp. em farinhas de origem animal naturalmente contaminadas e determinar o limite de detecção (LD) do método por meio de amostras artificialmente contaminadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho, foram utilizadas 20 amostras de farinhas de origem animal naturalmente contaminadas, oriundas do Laboratório Unianálises, as quais foram avaliadas qualitativamente na detecção de *Salmonella* sp. conforme metodologia preconizada pela AFAQ AFNOR CERTIFICATION (BIO 12/16 – 09/05) (MINI-VIDAS – BIOMERIEUX). Posteriormente, as amostras foram submetidas ao método modificado de quantificação proposto por Escartin e colaboradores (1995). As análises foram realizadas entre março e maio de 2012.

A primeira etapa incluiu o enriquecimento não seletivo, em que foram pesados 25 g de amostra e acrescidos 225 mL de água peptonada tamponada 1% (Oxoid, Inglaterra), homogeneizando em Stomacher por 60 segundos. Após realizaram-se diluições em que foram utilizadas séries de nove tubos para cada amostra. Na primeira série de três tubos acrescentou-se 10 mL da amostra diluída (10^{-1}), na segunda série de três tubos contendo 9 mL de água peptonada tamponada 1%, acrescentou-se 1 mL da amostra diluída 10^{-1} representando, assim, 10^{-2} . Nos últimos três tubos contendo 9 mL de água peptonada tamponada 1%, primeiro diluiu-se 1 mL da amostra em 9 mL de peptona salina (Oxoid, Inglaterra) e, desta diluição, acrescentou-se 1 mL nos três últimos tubos (10^{-3}). Os tubos foram incubados a 37 °C por 18 horas.

Para o enriquecimento seletivo, inocularam-se alíquotas de 0,1 mL dos tubos de enriquecimento não seletivo para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (BD, França), as quais foram incubadas por 24 horas a 42 °C. As culturas dos caldos RV foram estriadas em ágar Xilose Lisina Tergitol-4 (XLT4) (BD, França) e Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) (Acumedia, Michigan) e incubadas por 24 horas a 37 °C, respectivamente. Colônias suspeitas no meio foram submetidas a testes bioquímicos para confirmação do resultado.

As colônias suspeitas foram semeadas nos ágar LIA (Lisina Iron Agar) (BD, França), SIM (Sulphide Indol Motility) (Merck, Alemanha), TSI (Triple Sugar Iron Agar) (Merck, Alemanha) e Ureia (Merck, Alemanha). Os isolados com resultados compatíveis com *Salmonella* sp. foram confirmados por meio de prova de oxidase (LB, Brasil) e aglutinação com soro polivalente anti-O (Probac, Brasil).

O número de placas positivas para *Salmonella* sp. foi avaliado com base na tabela de Número Mais Provável (BAM, 1998a).

Para a determinação do LD do método, foram contaminadas artificialmente quatro alíquotas de 25 g de uma amostra de farinha de origem animal previamente analisada, e com ausência de *Salmonella* sp. no resultado. Para a contaminação das alíquotas foi utilizado 1 mL das diluições seriadas de 10^{-5} a 10^{-8} a partir da fase estacionária de *Salmonella* Enteritides (ATCC 13076) em caldo BHI (Brain Heart Infusion). As etapas seguintes da análise foram realizadas de acordo com o método citado anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram realizados 20 ensaios de amostras de farinhas de origem animal. Foi possível quantificar a presença de *Salmonella* sp. em 16 amostras, resultando em 80% do total avaliado. A variação da contagem entre as amostras foi de 0,3 NMP/g até >110 NMP/g, conforme Tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos nas amostras de farinhas de origem animal analisadas pelo método do Número Mais Provável por grama (NMP/g)

Amostra	Tubos positivos			NMP/g	Faixa de variação	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		Mínimo	Máximo
1	2	0	0	0,92	0,14	3,8
2	0	0	1	0,3	0,02	0,96
3	3	2	1	15	3,7	42
4	2	1	0	1,5	0,37	4,2
5	0	0	0	<0,3	-	0,95
6	3	3	0	24	4,2	100
7	0	2	0	0,62	0,12	1,8
8	0	0	0	<0,3	-	0,95
9	3	2	2	21	4	43
10	3	3	3	>110	42	-
11	3	3	3	>110	42	-
12	3	3	3	>110	42	-
13	1	0	0	0,36	0,02	1,8
14	0	0	0	<0,3	-	0,95
15	3	3	2	110	18	410
16	1	1	0	0,74	0,13	2
17	3	3	3	>110	42	-
18	3	3	0	24	4,2	100
19	0	0	0	<0,3	-	0,95
20	3	2	1	15	3,7	42

Fonte: Adaptado de BAM (1998a).

Nas amostras 5, 8, 14 e 19 determinou-se NMP <0,3, correspondendo à ausência de crescimento nas triplicatas das três diluições analisadas, não havendo recuperação da bactéria nos volumes semeados. Isso pode ter ocorrido devido à diferença na amostragem, pois foram retiradas alíquotas para a realização das análises qualitativas e, posteriormente, alíquotas para a realização das análises quantitativas.

Nas alíquotas retiradas para a realização das análises quantitativas das amostras 5, 8, 14 e 19 não continha *Salmonella* sp. ou apresentavam concentrações menores que 0,3NMP/g, sendo níveis não detectáveis pelo método de NMP. Outro fator que pode interferir são as células que se encontram em agrupamentos, não homogeneamente distribuídas nas amostras contaminadas.

Shashidhar, Srivastava e Bandekar (2011) avaliaram outro método utilizando NMP, associando Rappaport semissólido e confirmações com Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real e convencional, obtendo os mesmos resultados em comparação com a metodologia tradicional descrita no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM, 1998b) para amostras de alimentos na Índia. Resultado similar ao obtido neste trabalho, em que se obteve um percentual de equivalência de 80% das amostras positivas.

Na determinação do LD do método, observou-se crescimento de colônias a partir da diluição (10⁻⁸), equivalendo a aproximadamente 0,23 UFC/g de amostra, ou seja, 5,7 UFC em 25 g de amostra de farinha de origem animal, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Relação do número de células x diluição para a realização da contaminação artificial nas alíquotas de farinha de origem animal

Cepa de <i>Salmonella</i> Enteritides	Diluições	Nº de células
$5,7 \times 10^8$	10^0	570.000.000
$5,7 \times 10^7$	10^{-1}	57.000.000
$5,7 \times 10^6$	10^{-2}	5.700.000
$5,7 \times 10^5$	10^{-3}	570.000
$5,7 \times 10^4$	10^{-4}	57.000
$5,7 \times 10^3$	10^{-5}	5.700
$5,7 \times 10^2$	10^{-6}	570
$5,7 \times 10^1$	10^{-7}	57
$5,7 \times 10^0$	10^{-8}	5,7

Percebe-se, pelos resultados do LD citados acima, elevada sensibilidade do método avaliado. Comparando o resultado do LD determinado com o mínimo detectável expresso na tabela de NMP/g, observamos coerência nos resultados, uma vez que o LD de 0,23 está muito próximo do mínimo de 0,3 NMP/g.

Da mesma forma, Santos et al. (2005), avaliando a presença e a quantificação de *Salmonella* sp. em fazendas de perus na Carolina do Norte (EUA), concluíram que, apesar de a técnica por NMP ser mais cara e trabalhosa, ela se apresentou mais sensível do que a técnica qualitativa para amostras de origem fecal.

Dufrenne et al. (2001) avaliaram a quantificação de *Salmonella* sp. em carcaças de frango congeladas e resfriadas pelos métodos de NMP e contagem direta em placa. Concluíram que o método de NMP produz resultados mais próximos ao número verdadeiro de organismos presentes em uma amostra, já que a contagem direta de *Salmonella* sp. em placas foi influenciada negativamente pelo grande número de bactérias competidoras presentes na flora das carcaças de frango.

Borowsky (2005) contaminou artificialmente amostras de embutidos com 10^1 , 10^2 e 10^3 UFC e avaliou dois métodos para a estimativa do NMP de *Salmonella* sp., com o objetivo de definir aquela com melhor aplicabilidade para embutidos de carne suína. Os autor concluiu que o mesmo método utilizado no presente trabalho, demonstrou valores médios mais próximos das quantidades inoculadas, sendo considerado o mais adequado para analisar amostras de embutidos. Após a realização da presente pesquisa, esse método também é considerado adequado para analisar amostras de farinhas de origem animal.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que a metodologia aplicada empregando o NMP é eficiente e sensível, equiparável à técnica qualitativa de referência. Além disso, apresenta a vantagem da quantificação da contaminação presente nas amostras, podendo futuramente colaborar com o estabelecimento de níveis de risco e contribuir significativamente na implantação de medidas de controle e verificação na indústria de farinhas de origem animal e subprodutos.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, R.; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Estudo da ocorrência de salmonelas em ingredientes, rações e suabes de pó colhidos em uma fábrica industrial de ração. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 6, 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141395961999000600008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 22 abril 2012.
- BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL - BAM. **Appendix 2: Most Probable Number Determination from Serial Dilutions**. Ed. 8, revision A. 1998a. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2012.
- BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL - BAM. **Chapter 5: Salmonella**. ANDREWS, W.H., HAMMACK, T.S. 1998b. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-5.html>>. Acesso em: 10 abr. 2012.
- BELLAVER, C.; ZANOTTO, D. L. Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos proteicos de origem animal. In: PALESTRA APRESENTADA NA CONFERÊNCIA APINCO, Santos. **Anais...**, Santos-SP, 2004.
- BELLAVER, C. Ingredientes de origem animal destinados à fabricação de rações. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2001a.
- BELLAVER, C. Aspectos técnicos e econômicos da utilização de sub-produtos de origem animal na alimentação de frangos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL ACAV/EMBRAPA SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, 2, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa, 2001b.
- BOROWSKY, L. M. **Comparação de dois métodos de quantificação de Salmonella sp. em embutidos suínos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS. Porto Alegre. 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa Nº 34**. Brasília, 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 24 abr. 2012.
- DUFRENNE, J. et al. Quantification of the contamination of chicken and chicken products in The Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. **Journal of Food Protection**. v. 64, n. 4, p. 538-541, 2001.
- ESCARTÍN, E. F. et al. Incidence and level of Salmonella serovarvs in raw pork obtained from Mexican butcher shops. **Food Microbiology**, v. 12, p. 435-439, 1995.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, p. 162.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 545-552.
- MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Esterilização de farinha de subprodutos animais em esterilizador industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, mar. 2008.
- NETO, L. S. da L.; VOLPI, R.; REIS, P. A. dos. **Microbiologia e Parasitologia**. Goiânia: AB, 2003.
- SANTOS, E. J. dos, et al. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no estado de Minas Gerais para produção de ração animal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 2, p. 425-433, Abr./Jun., 2000.

SANTOS, F. B. O. et al. Estimation of Most Probable Number *Salmonella* Populations on Commercial North Carolina Turkey Farms. **Journal of Applied Poultry Research**, n 14, p.700-708, 2005.

SHASHIDHAR, R., SRIVASTAVA, I., BANDEKAR, J. R. Quantification of *Salmonella* in Food Samples from India Using the MINI-MSRV MPN and Modified MINI-MSRV MPN. **Methods Journal of Food Science**. v. 76, n. 8, p. 564-567, 2011.

SINDIRAÇÕES. **Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal**. Disponível em: <<http://www.sindiracoes.org.br>>. Acesso em: 10 maio 2012.

SPRICIGO, D. A. et al. Prevalência, quantificação e resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguiça fresca suína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p. 779-785, out./dez., 2008.