

ANO XIII- Nº 1

ISSN: 0872 - 7098

revista portuguesa de

ZOOTECNIA



APZ

ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE ENGENHEIROS ZOOTÉCNICOS

FICHA TÉCNICA

Director:

António Ferreira

Administrador:

J. Carlos Almeida

Editor:

António A. Fontainhas Fernandes

Editor-adjunto:

Miguel Rodrigues

Comissão editorial:

Alfredo Teixeira

Claudino Matos

Emídio Gomes

Jorge Azevedo

Oldemiro Rego

Raquel Lucas

Vasco Fitas Cruz

Propriedade:

Associação Portuguesa dos Engenheiros
Zootécnicos (APEZ)

Design gráfico e impressão:

Emílio Santos e Adelaide Ferreira
Serviços Gráficos da UTAD

Periodicidade: Semestral

Depósito Legal N° 76207/94

Tiragem: 600 exemplares

Preço: 7,50 euros

Distribuição gratuita aos sócios

O conteúdo dos artigos assinados é da
responsabilidade dos autores.

Endereço/Address:

Apartado 1013, 5000-911 Vila Real, Portugal

Telef: (+351) 259 350531

Fax: (+351) 259 350560

fontain@utad.pt

<http://www.utad.pt/apez>

Apoios:



Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

FCT

Fundação para a Ciência e Tecnologia

Fundação para a Ciência e Tecnologia

Programa Operacional Ciência, Tecnologia, Inovação do Quadro Comunitário de Apoio III

É permitida a reprodução do conteúdo desta revista

The reproduction of the content of this publication is permitted

Desejamos estabelecer permuta com outras publicações

We wish to establish exchange with other publications

Os trabalhos submetidos para publicação são analisados por especialistas

Papers submitted for publication are peer reviewed

ANO XIII - Nº 1

ANO XIII - Nº 1

APEZ 2006

REDUÇÃO 80%

ÍNDICE

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE FABRICO DO CHOURIÇO TRADICIONAL ALENTEJANO M. ELIAS, M.J. FRAQUEZA e A. BARRETO	1
HÁBITOS DE CONSUMO DE ENCHIDOS TRADICIONAIS NO SUL DE PORTUGAL M. ELIAS, M.J. FRAQUEZA e A. BARRETO	11
COMPORTAMENTO DE LISTERIA MONOCYTOGENES NA CARNE DE PERU EMBALADA EM ATMOSFERA MODIFICADA COM MISTURAS DE GASES CONTENDO ARGON OU MONÓXIDO DE CARBONO M.J. FRAQUEZA, M.C. FERREIRA e A.S. BARRETO	19
IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO DE UMA ASSOCIAÇÃO ANTIBIÓTICA CONTENDO FURAZOLIDONA NO NÍVEL DE ANTIBIORRESISTÊNCIAS EM ESCHERICHIA COLI E ENTEROCOCCUS SPP. EM FRANGOS P. MARTINS DA COSTA, T. NUNES, P. VAZ-PIRES e F. BERNARDO	37

TYOLOGY OF THE TRADITIONAL SAUSAGE PRODUCTION FROM ALENTEJO

M. ELIAS⁽¹⁾, M.J. FRAQUEZA⁽²⁾ e A. BARRETO⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade de Évora, Área Departamental de Ciências Agrárias, Apartado 94, 7002 - 554 Évora; ⁽²⁾Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, CIISA, R. Prof. Cid dos Santos – Pólo Universitário, Alto da Ajuda, 1300 – 477 Lisboa

(Recepção: 13 de Setembro de 2005; Aprovado: 15 de Outubro de 2005)

ABSTRACT

26 factories from Alentejo region were inquired about traditional sausage process. The aim of the questionnaire were related with social and economic aspects, raw material and processing. Almost all factories use a proportion lean/ fat in the mix near 70/ 30, or even 80/ 20. Ingredients such as garlic and sweet paprika were always used and the largest part of factories smoke their products in very different ambient conditions. Cured period is also very variable, among 2 and 42 days. 85% of factories keep their products, until sell them, on vacuum conditions, mainly, or even in modified atmosphere.

Key-words: sausage production, Alentejo

CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO DE FABRICO DO CHOURIÇO TRADICIONAL ALENTEJANO

RESUMO

Foi recolhida informação a partir de inquéritos presenciais realizados em 26 salsicharias instaladas no Alentejo a fim de caracterizar o processo de fabrico do chouriço tradicional alentejano. Abordaram-se alguns aspectos sócio-económicos, outros relacionados com as matérias-primas e o processamento. A quase totalidade dos fabricantes inquiridos utiliza, para constituição das massas de carne, rácios carne/gordura de 70/ 30, ou nalguns casos 80/ 20. O sal e as massas de alho e pimentão são ingredientes sempre usados e a grande maioria dos fabricantes recorre à fumagem dos enchidos, em condições de temperatura e de humidade relativa do ar muito variáveis. O período de cura é muito variável entre os produtores, com limites situados entre os 2 e os 42 dias. A maior parte dos produtores (85%) mantém, até à comercialização, o produto final embalado, sob vácuo, principalmente, ou sob um tipo de atmosfera modificada.

Palavras-chave: Alentejo, produção em salsicharia

INTRODUÇÃO

A indústria da salsicharia conjuga várias operações cujo objectivo último, na sua génese, é o aproveitamento tão completo quanto possível da carne, vísceras, gorduras e sangue do porco e a sua conservação para usos diversificados.

No que respeita à tecnologia da produção de chouriço, de um modo geral podem-se considerar seis fases: selecção da carne e da gordura, miga, preparação da massa, maturação da massa, enchimento e cura (Liepe, 1985; Muguerza *et al.*, 2004; Ruusunen e Poulanne, 2004)

Na opinião de Pezacki (1979), as carnes utilizadas na produção de enchidos devem ser firmes, com elevado poder tampão e boa capacidade de retenção de água e com valores de pH entre 5,4 e 6,0. A gordura deve ser também firme, na grande maioria dos casos o toucinho dorsal, com baixo teor em ácidos gordos insaturados, uma vez que aumentam a ocorrência de fenómenos autoxidativos e de exsudação da gordura do enchido (Frey, 1995). Segundo Alvarez (1994) e Fallola *et al.* (1998), constituem excepção os enchidos elaborados com carnes de porcos do tronco Ibérico. A gordura destes animais é caracterizada por um elevado nível de insaturação, com repercussão directa no aroma e no sabor dos enchidos. Contudo, está protegida da rancificação pela presença de tocoferóis e polifenóis que os animais ingerem, principalmente quando são alimentados na montanha.

A miga reduz a matéria-prima (carne e gordura) a fragmentos com dimensões adequadas. Por outro lado, o grau de redução de tamanho está directamente relacionado com a eliminação de água, mais lenta nos fragmentos de maior dimensão e com a ligação das massas, maior com fragmentos de menor dimensão.

Na preparação das massas os outros ingredientes são adicionados às matérias-primas principais e misturados até se obter uma massa homogénea.

A fase de maturação das massas é caracterizada, essencialmente, pela entrada de sal nos fragmentos de carne e concomitante extracção de água e proteínas miofibrilhares e pelo desenvolvimento microbiano, do que resulta a libertação de produtos do seu metabolismo. As proteínas miofibrilhares, quando extraídas, tornam viscosas as superfícies dos fragmentos e desempenham um papel determinante na ligação das massas (Frey, 1995).

Na operação de enchimento, a massa maturada é introduzida em tripa. Este invólucro proporciona à massa coesão, forma e dimensão, protegendo-a de influências externas superficiais, designadamente contaminações microbianas, não podendo constituir ela própria uma fonte de contaminação, microbiana ou química.

A cura, que em Portugal está quase sempre associada à fumagem, dá continuidade aos processos físicos, químicos, bioquímicos e microbiológicos, iniciados na fase de maturação, e resultará num produto com características organolépticas e de conservação completamente diferentes das da matéria-prima que lhe deu origem (Rosário, 1989). Deste modo, o chouriço de carne adquire a estabilidade pela acidificação resultante da fermentação, pela desidratação, com consequente aumento do teor em sais e decréscimo da actividade da água, e também pela acção do fumo.

Este trabalho teve como objectivo caracterizar o processo de fabrico do chouriço tradicional alentejano em salsicharias tradicionais abordando também aspectos socio-económicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram realizados inquéritos presenciais, usando um modelo de questionário concebido para o efeito, em 26 salsicharias das cerca de 100 licenciadas existentes no Alentejo. Os questionários abordaram aspectos socio-económicos, outros relativos à matéria-prima e aos ingredientes e ainda outros relacionados com o processamento. A duração média de cada entrevista foi de, aproximadamente, 25 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aspectos socio-económicos

Todas as salsicharias inquiridas produzem enchidos ao longo de todo o ano e cerca de 40% tem produções totais anuais que variam entre 10 000 e 50 000 kg (Figura 1). Trata-se portanto de unidades de pequena dimensão. Apenas 2 fábricas, correspondendo a 7,7% das 26 inquiridas, produzem anualmente mais de 200 ton de produto acabado.

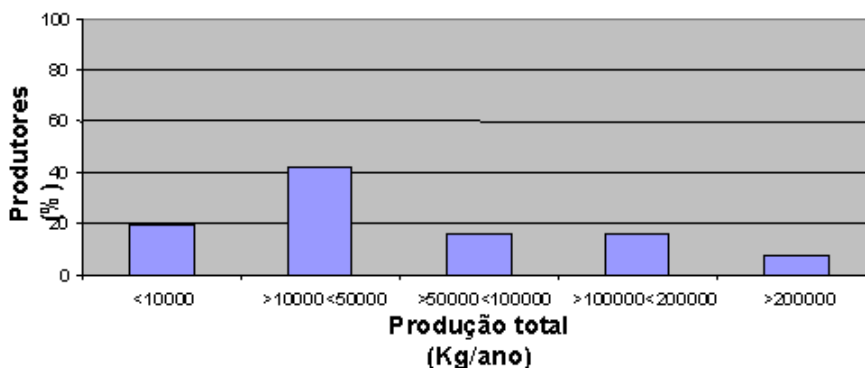


Figura 1. Produções totais anuais de produto acabado.

Os resultados apresentados na Fig. 2 confirmam a pequena dimensão da maioria das empresas inquiridas. Com efeito, pouco menos de 50% dos produtores têm entre 5 e 10 pessoas directamente envolvidas no processamento das carnes (excluem-se funcionários administrativos e os ligados aos circuitos de comercialização), havendo mais de 30% das fábricas com menos de 5 pessoas.

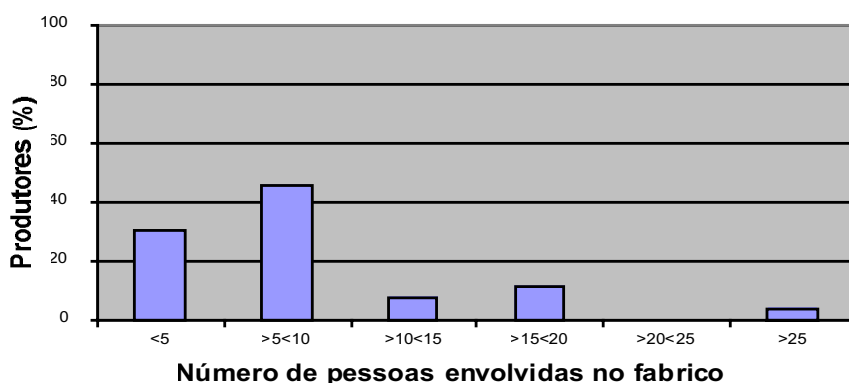


Figura 2. Número de pessoas directamente envolvidas no fabrico de enchidos.

Matéria-prima e ingredientes

Todos os produtores transformam carne e gordura do porco da raça Alentejana, contudo, apenas 15% das fábricas (4 unidades) se dedicam exclusivamente à laboração de produtos do porco Alentejano. Considerando a totalidade da produção do universo inquirido, 65% resulta da utilização de raças porcinas precoces e 35% do porco da raça Alentejana. São utilizadas carcaças com pesos próximos de 80 kg e 7 meses de idade, para as raças precoces, e entre 100 - 120 kg, com 10 - 14 meses de idade, para os animais da raça Alentejana e seus cruzamentos. Todos os produtores refrigeram tanto a carne como a gordura antes da sua utilização no processo de fabrico.

Nas massas destinadas à produção de chouriço, a razão carne/ gordura mais utilizada é de 70/30 (cerca de 60% dos produtores), usando mais de 30% dos produtores o rácio 80/20 (Fig. 3).

As carnes usadas no fabrico do chouriço têm origem, principalmente, na pá, entremeada e perna. Em menor proporção, recorre-se também a carnes do cachaço e do lombo. A gordura mais usada é a da entremeada, embora seja utilizada também a da manta de toucinho.

Os ingredientes utilizados são a massa de pimentão (40 - 80 g por kg de massa de carne), a massa de alho (5 - 30 g por kg de massa de carne) e o sal

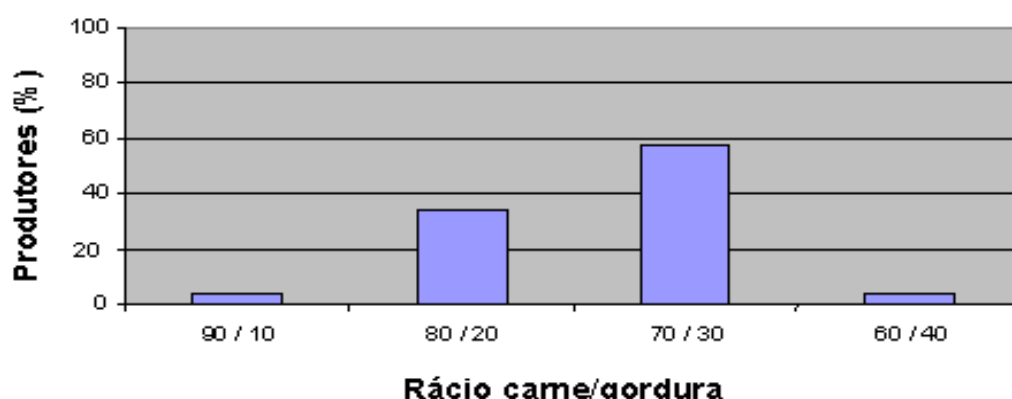


Figura 3. Razão entre o teor de carne e o de gordura usada no fabrico de chouriço.

(10 - 20 g por kg de massa de carne). 62% dos produtores usam também misturas comerciais com nitrato, nitrito, fosfatos e ascorbatos. Apenas 1 dos inquiridos usa vinho como ingrediente, na concentração de 2 ml por kg de massa de carne.

Nenhum fabricante de enchidos adiciona culturas de arranque ou açúcar às massas de carne. As culturas de arranque são culturas microbianas, normalmente compostas por microrganismos da família Micrococcaceae ou por bactérias lácticas, em cultura pura ou mista, aplicadas com o objectivo de se atingir determinado fim, como a melhoria da salubridade, da cor, da textura, do sabor e do valor nutritivo do produto, entre outros aspectos. A adição de açúcar tem como objectivo principal fornecer uma fonte de energia facilmente utilizável aos microrganismos de interesse tecnológico, que em condições normais são os que existem em maior quantidade nas massas de carne. Deste modo, por crescimento competitivo estes microrganismos vão multiplicar-se mais rapidamente que os outros grupos microbianos.

O intestino delgado de porco, salgado e refrigerado, é usado como invólucro para o chouriço por 92,3% dos produtores. Somente 2 deles (7,7%) usam como invólucro tripa de colagénio.

Processamento

Apenas uma das salsicharias objecto de estudo procede ao corte manual da carne e da gordura. As restantes utilizam picadoras eléctricas. Quanto ao diâmetro dos orifícios dos crivos usados para a picagem da carne e da gordura, 35% dos produtores utilizam crivos com 10 - 15 mm de diâmetro, 30% utilizam diâmetros de 20- 30 mm e cerca de 20% inferiores a 10 mm (Fig. 4).

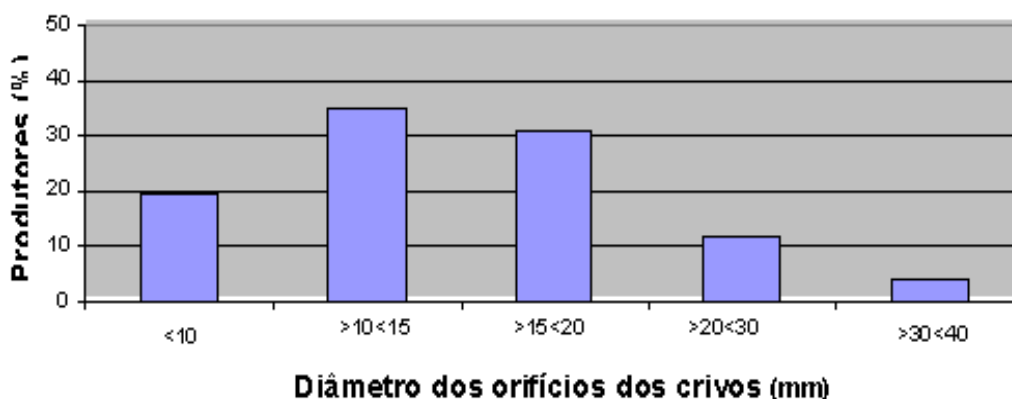


Figura 4. Diâmetro dos orifícios dos crivos usados para a picagem da carne e da gordura.

A duração da fase de maturação das massas de carne varia entre 24 e 48 horas em 60% dos produtores (Fig. 5), ocorrendo esta fase em câmaras cuja temperatura se situa entre os 2 e os 6 °C, consoante os produtores (Fig. 6).

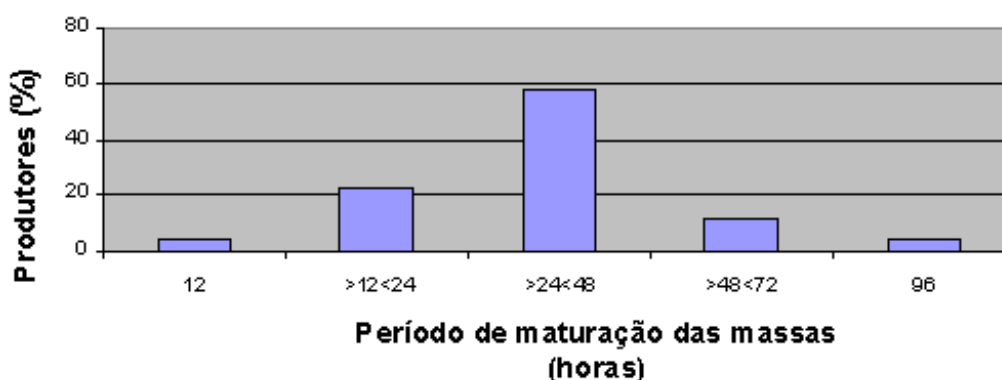


Figura 5. Duração (horas) da etapa de maturação das massas de carne.

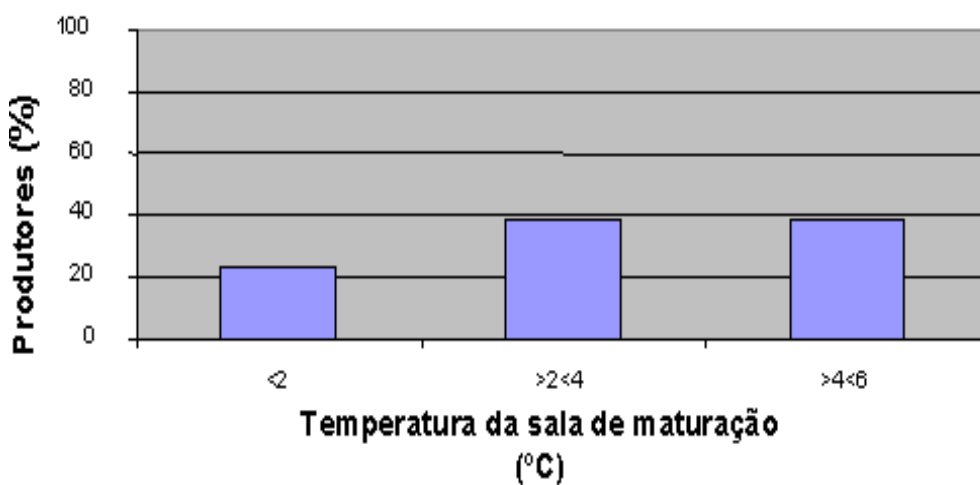


Figura 6. Temperatura (°C) do ar da câmara onde ocorre a maturação das massas de carne.

Apenas dois dos fabricantes inquiridos não submetem o chouriço a fumagem e os 24 fabricantes que fumam os seus enchidos utilizam sempre lenha de azinho.

Considerando que a cura dos enchidos tem uma primeira fase onde ocorre a fermentação das massas e uma segunda fase, designada por secagem, onde tanto a actividade microbiana como os fenómenos proteolíticos e lipolíticos são menos acentuados, nos chouriços fumados a fase de fermentação ocorre no fumeiro. Nesta estrutura os valores da temperatura e da humidade relativa são muito variáveis (Fig. 7 e 8), dependendo da época do ano e da hora do dia, com valores de temperatura mais baixos e de humidade relativa mais elevados nas noites de Inverno. Assim, enquanto nos fumeiros podem ocorrer variações de temperatura entre valores inferiores a 10 °C até mais de a 40 °C, nos dois fabricantes que não recorrem à fumagem a fase de fermentação ocorre entre 10 - 12 °C.

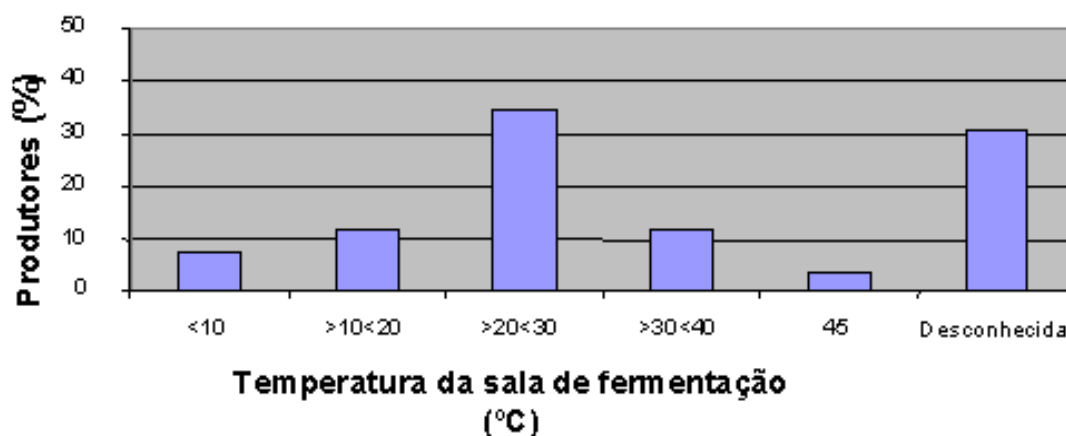


Figura 7. Temperatura do ar (°C) durante a fase de fermentação do chouriço.

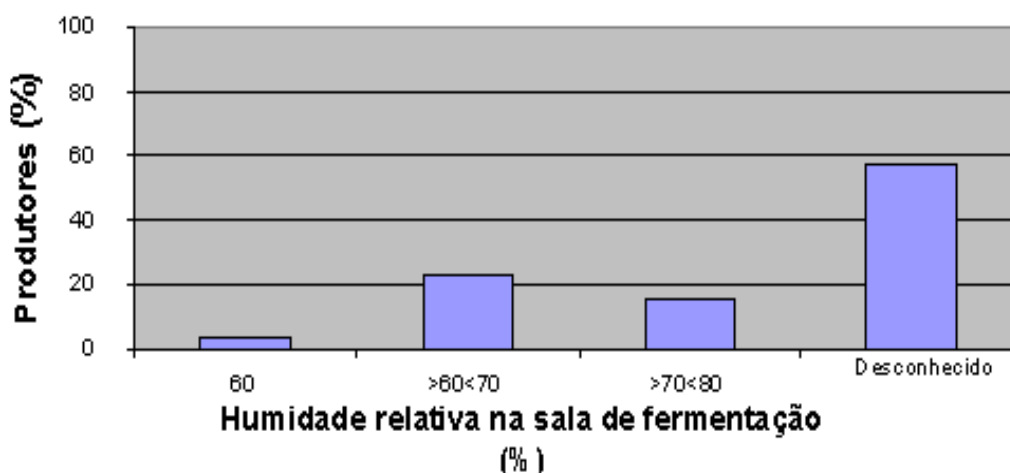


Figura 8. Humidade relativa do ar (%) durante a fase de fermentação do chouriço.

Durante a fase de secagem do chouriço os valores da temperatura, no conjunto dos inquiridos, variam entre cerca de 10 e 20 °C (Fig. 9). Nos dois produtores que não usam a fumagem, a fase de secagem ocorre em câmaras de ambiente controlado, com temperaturas variáveis entre 12 - 15 °C e humidade relativa variável entre 70 e 80%. Nos restantes produtores a secagem tanto pode ocorrer em câmaras de ambiente controlado, como em salas à temperatura ambiente ou mesmo no próprio fumeiro, pelo que se encontram grandes variações nos parâmetros ambientais a que ocorre a secagem do chouriço (Fig. 9 e 10).

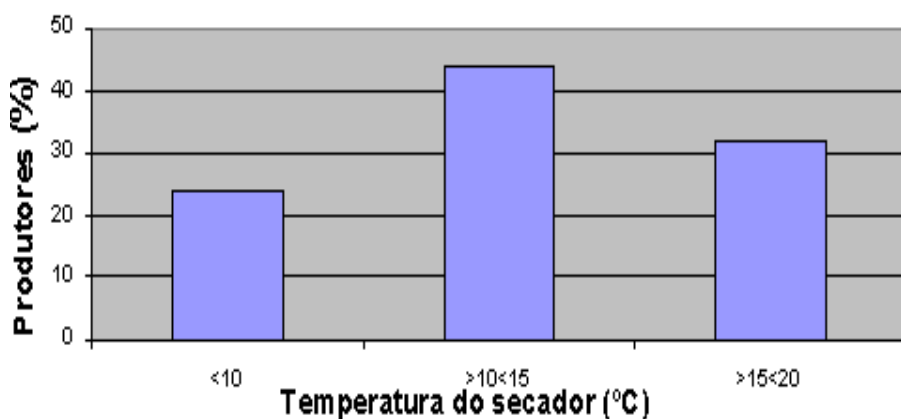


Figura 9. Temperatura do ar (°C) durante a fase de secagem do chouriço.

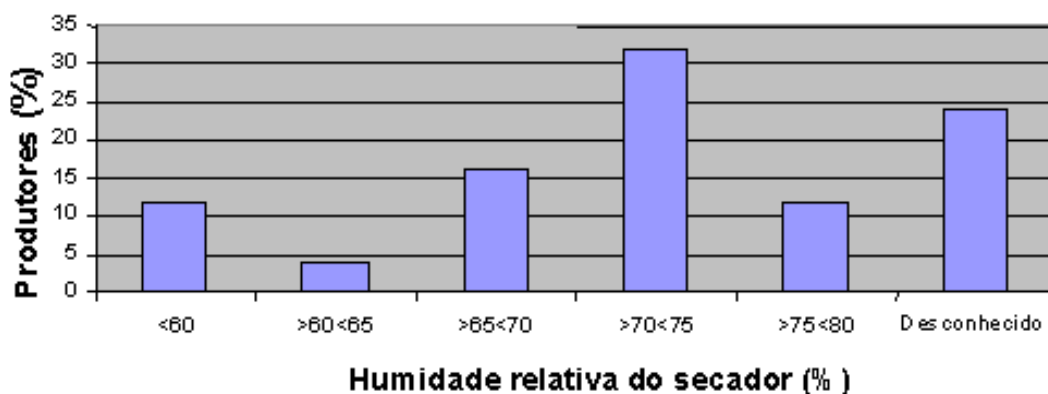


Figura 10. Humidade relativa do ar (%) durante a fase de secagem do chouriço.

A duração do período de cura do chouriço (considerado as fases de fermentação e secagem) tem variações muito acentuadas: desde os 2 dias, nos produtos fumados mais intensamente até aos 42 dias (Fig. 11).

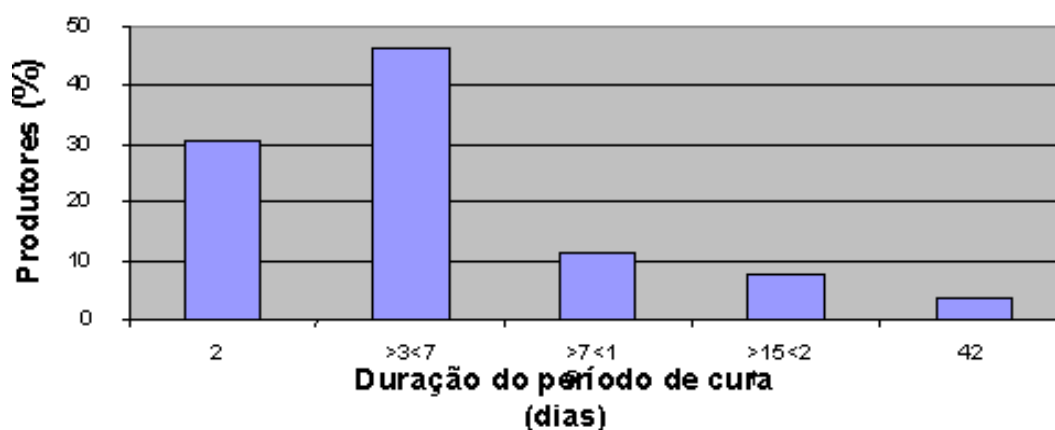


Figura 11. Duração (dias) do período de cura do chouriço.

Por questões higiénicas e económicas, sobretudo relacionadas com as perdas de peso, 85% dos produtores mantêm os chouriços acabados embalados sob vácuo, principalmente, ou sob um tipo de atmosfera modificada, em película plástica. 90% dos inquiridos comercializam os enchidos etiquetados e 65% dos fabricantes com Indicação Geográfica Protegida (IGP), embora a grande maioria da produção de chouriço não seja comercializada com esta forma de protecção. Este comportamento deve-se ao acréscimo de custo que o processo de protecção implica sobre o valor de venda do produto, tornando-se esta protecção muitas vezes desnecessária para consumidores fiéis e conhecedores da origem dos enchidos que adquirem, dispensando por essa razão não somente o selo de protecção mas, principalmente, o acréscimo de preço que lhe está associado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No âmbito deste trabalho realizaram-se inquéritos em fábricas com dimensão muito variada; desta forma pretendemos ter uma ideia geral da realidade da produção de chouriço no Alentejo. Assim, quase todos os fabricantes utilizam rácios carne/gordura de 70/30, principalmente, ou 80/20. As carnes usadas no fabrico do chouriço procedem, principalmente, da pá, entremeada e perna e a gordura mais utilizada é a da entremeada. O sal e as massas de alho e de pimentão são sempre utilizados. No entanto, 62% dos fabricantes utilizam também misturas comerciais contendo nitrato, nitrito, fosfatos e ascorbatos. A grande maioria dos fabricantes (24 dos 26 inquiridos) recorre à fumagem dos enchidos e durante esta operação as temperaturas podem variar entre 10 °C e mais de 40 °C. Após

a fumagem, os enchidos continuam sujeitos a grandes variações de temperatura, dependendo estas também dos fabricantes. As condições de fabrico entre produtores e o critério para considerarem o produto acabado são tão díspares que o período de cura para o chouriço varia entre os 2 dias, para alguns produtores, e os 42 dias que adopta um dos fabricantes. A maior parte dos produtores (85%) mantém o produto final embalado sob vácuo, principalmente, ou sob um tipo de atmosfera modificada e 65% comercializa parte da sua produção de chouriço com o selo de Indicação Geográfica Protegida. Nestes casos os enchidos são feitos com carne e gordura do porco da raça Alentejana.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto europeu "Assessment and improvement of safety of traditional dry sausages from producers to consumers" (TRADISAUSAGE, QLK1-CT-2002-02240).

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, M.F., 1994. Efectos de la adición de lipase pancreática en la maduración de embutidos crudos curados. Dissertação para obtenção do grau de Doutor. Faculdade de Veterinária, Universidade Complutense de Madrid.
- Fallola, A., Sanabria, C., Sábio, E., Vidal-Aragón, M.C. e Espárrago, F., 1998. The extensive pig quality. Proceedings of the International Symposium on Basis of the Quality of Typical Mediterranean Animal Products. European Association for Animal Production (EAAP). 90, pp. 320-338.
- Frey, W., 1995. Fabricación Fiable de Embutidos. Acribia (eds.), Zaragoza, Espanha.
- Liepe, H.U., 1985. Starter cultures in meat production. Food and Feed Production With Microorganisms. In: Biothechnology. Reed (eds.), Verlag Chemie, Weinheim. Vol.5, pp. 399-424.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorema, D. e Astiasarán, I., 2004. New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. Trends in Food Science & Technology. Elsevier Applied Science Publishers (eds.), Londres, Reino Unido.
- Pezacki, W., 1979. Some basic facts about dry sausages manufacture. Fleischwirtsch, 59 (2): 219-223.
- Rosário, M.C., 1989. Efeitos de aditivos químicos nas características do salpicão tradicional de Vila Real ao longo do processo de cura. Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Alimentar. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Ruusunen, M. e Poulanne, E., 2004. Sodium in meat products. Proc. 50th International Congress of Meat Science and Technology, Helsinki, Finlândia.

CONSUMER HABITS FOR TRADITIONAL DRY SAUSAGE IN THE SOUTH OF PORTUGAL

M. ELIAS⁽¹⁾, M.J. FRAQUEZA⁽²⁾ e A. BARRETO⁽²⁾

⁽¹⁾Universidade de Évora, Área Departamental de Ciências Agrárias, Apartado 94, 7002 - 554 Évora; ⁽²⁾Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, CIISA, R. Prof. Cid dos Santos – Pólo Universitário, Alto da Ajuda, 1300 – 477 Lisboa

(Recepção: 13 de Setembro de 2005; Aprovado: 15 de Outubro de 2005)

ABSTRACT

120 persons from Lisboa, Santarém, Portalegre, Évora e Beja regions were inquired about their social-economic characteristics, consumer and handling habits of traditional dry sausage. People inquired were mainly young, female, with college education. They prefer sausages medium size (250 – 350g) bought in supermarket and they buy until 4 sausages per month. The majority of the consumers keep them in refrigerator before and after the beginning of their consumption.

Key words: traditional dry sausage, consumer habits, Portugal

HÁBITOS DE CONSUMO DE ENCHIDOS TRADICIONAIS NO SUL DE PORTUGAL

RESUMO

A partir de um universo de 120 pessoas inquiridas nos distritos de Lisboa, Santarém, Portalegre, Évora e Beja foi recolhida informação sobre algumas características sociais das pessoas, hábitos de aquisição e hábitos de manuseamento de enchidos, tanto antes como depois de iniciado o seu consumo. O universo estudado foi composto, principalmente, por pessoas jovens, do sexo feminino e com um curso superior. Os enchidos mais frequentemente comprados são de tamanho médio (250–350 g), adquiridos principalmente no supermercado e até 4 unidades de enchido por mês. A grande maioria dos consumidores mantém os enchidos no frigorífico, tanto antes como depois do seu consumo.

Palavras-chave: enchidos tradicionais, hábitos de consumo, Portugal

INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos que o Homem sentiu a necessidade de conservar a carne dos animais que caçava nas estações de abundância para

consumo posterior, quando a caça não fosse possível. Esta necessidade de conservar a carne terá estado na origem da salsicharia. Práticas como a secagem ou a fumagem da carne, conhecidas desde o Paleolítico Superior (40 000 a 12 000 anos a.C.) resultaram da necessidade de prolongar a duração da conservação daquele alimento e não de um imperativo do paladar. A secagem e a fermentação das carnes, provavelmente, são os processos mais antigos a que se recorreu para a conservação das carnes (Bacus, 1984; Incze, 2000).

Nas regiões do interior de Portugal, até há poucas décadas atrás não havia electricidade em muitas casas de habitação, sobretudo nas zonas rurais. Nestas condições, a salga das carnes e do toucinho e o fabrico de enchidos no período do Inverno, aproveitando as baixas temperaturas para maior garantia da salubridade dos produtos, eram práticas fundamentais para garantir uma fonte de proteína e gordura de origem animal durante o resto do ano (Elias, 2004).

Na actualidade, o fabrico de enchidos representa uma parte muito importante da indústria de carnes da Europa Continental e a sua área de maior influência são os países mediterrânicos e a Alemanha, um dos principais países produtores de enchidos, embora o seu desenvolvimento só tenha acontecido a partir da segunda metade do século XIX (Fernández, 2000). Hoje em dia, a produção de enchidos cresce cada vez mais em países que até há pouco tempo atrás pouco interesse tinham por este tipo de produção, como são os casos dos Estados Unidos, Austrália, Grã-Bretanha, Brasil e Japão (Demeyer *et al.*, 1987; Fernández, 2000).

Segundo o Instituto Nacional de Estatística, nos anos de 1999, 2000 e 2001 em Portugal produziram-se, respectivamente, 17349, 19592 e 22182 toneladas de enchidos, correspondendo 70% destes valores a chouriços de carne. De acordo com a mesma fonte, a população residente em Portugal em 2001 era de 10356 117. Deste modo e para aquele ano o consumo de enchidos *per capita* foi de 2,14 kg, cerca de metade dos 4,1 kg *per capita* indicados por Fernández (2000) para o consumo de enchidos curados em Espanha em 1998.

Face a esta realidade de consumo de enchidos curados em Portugal e atendendo a que cada vez mais a segurança sanitária do produto deve ser garantida (Sanco/4198/2001), podendo contudo, ser alterada após compra por práticas indevidas do próprio consumidor até ao momento em que o produto é consumido, foi nosso objectivo elaborar um inquérito para avaliação dos hábitos dos consumidores, manipulação e modos de conservação de enchidos curados tradicionais.

MATERIAL E MÉTODOS

População inquirida e modo de realização do inquérito

Foram realizados, presencialmente, inquéritos a 120 pessoas de ambos os sexos e diferentes idades, nos distritos de Lisboa, Santarém, Portalegre, Évora e Beja, consumidores de enchidos tradicionais.

Estrutura do inquérito

O inquérito foi concebido e testado antecipadamente, apresentando questões fechadas, sobre três aspectos diferentes:

- Características socio-económicas da população inquirida (idade, sexo, estado civil, habilitações literárias);
- Hábitos de aquisição e consumo dos enchidos curados (frequência de compra, local habitual de compra, nº de unidades adquiridas mensalmente, tamanho dos enchidos comprados com maior frequência, nº de fatias consumidas diariamente por pessoa);
- Hábitos de manuseamento antes de consumir os enchidos (tipo de embalagem do enchido no acto de compra, tipo de embalagem do enchido em casa, local e duração do armazenamento em casa até iniciar o consumo);
- Hábitos de manuseamento após o início do consumo (tipo de embalagem do enchido após início do consumo, modo de apresentação do enchido conservado durante o período de consumo, local de armazenamento e tempo necessário para consumir uma unidade de enchido).

Análise dos resultados

Para a análise dos resultados realizou-se uma descrição percentual do número de respostas obtidas para cada pergunta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro I apresenta algumas características sociais dos 120 indivíduos inquiridos no âmbito do presente trabalho. Da sua análise conclui-se que a

população inquirida era jovem. 47,9% dos indivíduos tinham idade inferior a 30 anos e eram maioritariamente do sexo feminino (61,2%). 48,8% dos inquiridos eram solteiros e 44,6% eram casados. A amostra que serviu de base a este estudo foi composta por indivíduos com um elevado nível de escolaridade, em que a maior parte (62,3%) disse ter um curso superior.

QUADRO I - CARACTERÍSTICAS SOCIAIS DA POPULAÇÃO INQUIRIDA.

Idade (anos)	%
< 30	47,9
30 – 50	34,7
> 50	17,4
Sexo	%
masculino	38,8
feminino	61,2
Estado civil	%
solteiro	48,8
casado	44,6
outro	6,6
Habilitações literárias	%
< 9º ano	8,4
9º ano	8,5
12º ano	20,8
curso superior	62,3

Para cerca de metade (50,4%) dos indivíduos inquiridos é pouco usual a compra de enchidos e 48,8% considera comprar enchidos com regularidade (Quadro II). A maior parte dos consumidores (71,1%) adquire enchidos no supermercado. Ainda persiste o hábito de alguns consumidores comprarem os enchidos no talho (18,2%) e são poucos os que recorrem à mercearia (5,8%), à fábrica de produção (3,3%) ou a mercados ambulatórios (1,6%). No entanto, consideramos que o grupo de pessoas alvo de estudo não é um grande consumidor de enchidos, havendo mais de metade dos elementos daquele grupo (52,1%) que compra, mensalmente, até duas unidades, o que está de acordo com o baixo consumo diário apresentado. Na verdade, 50,0% consomem, em média, uma fatia de enchido por dia. Apenas 12,4% dos inquiridos afirmou comprar mais de quatro enchidos por mês e somente 7,8% consomem mais de 4 fatias de enchido por dia, em termos médios. Enchidos de média dimensão, como o paio, são comprados com maior frequência por 73,1% das pessoas inquiridas, enquanto 25,2% dos inquiridos diz comprar mais frequentemente enchidos de menor calibre,

como chouriços, linguiças, mouros e farinheiras, entre outros. Por outro lado, os enchidos de grande calibre, como os lombos e os palaios, são comprados por uma reduzida proporção (1,7%) da população estudada.

QUADRO II - HÁBITOS DE AQUISIÇÃO DE ENCHIDOS CURADOS.

Frequência na compra	%
regular	48,8
pouco usual	50,4
não compra	0,8
Local habitual de compra	%
fábrica	3,3
supermercado	71,1
mercearia	5,8
talho	18,2
mercado ambulatório	1,6
Nº de unidades de enchidos comprados mensalmente	%
0 – 2	52,1
3 – 4	35,5
mais de 4	12,4
Tamanho dos enchidos comprados com maior frequência	%
pequenos (< 250g)	25,2
médios (250-350g)	73,1
grandes (>350g)	1,7
Nº de fatias consumidas diariamente por pessoa	%
1	50,0
2 – 4	42,2
mais de 4	7,8

No que respeita aos hábitos de manuseamento dos enchidos antes de ser iniciado o seu consumo (Quadro III), verifica-se que na maioria dos casos, no acto da compra os enchidos estão acondicionados em película de plástico sob vácuo (30,7%), a granel e são colocados em saco plástico (25,2%) ou estão a granel e são protegidos com uma película de plástico aderente (22,8%). Apesar de haver um esforço por parte dos produtores em recorrer à embalagem sob um tipo de atmosfera modificada, no universo objecto de estudo existe um número pequeno de pessoas (6,3%) que adquire enchidos embalados desta forma. Quando estudamos o tipo de embalagem usada para armazenamento dos enchidos em casa, antes de iniciado o seu consumo, verificamos que comparativamente ao tipo de embalagem usada no acto da compra, houve diminuição no uso de embalagens de papel, película de plástico sob vácuo e sob

atmosfera modificada. Nenhum dos inquiridos guarda os enchidos em saco plástico. Assim, alguns dos enchidos que no acto da compra foram embrulhados em papel, estavam sob vácuo ou sob atmosfera modificada e todos os que estavam em sacos de plástico, passaram a ser guardados em película de plástico aderente, em folha de alumínio, em caixa de plástico ou mantiveram-se sem qualquer tipo de embalagem. Os consumidores guardam os enchidos, principalmente, no frigorífico (79,3%) e a maior parte (45,8%) consome-os entre 4 e 7 dias após a compra. Contudo, um número considerável de consumidores (36,4%) enceta os enchidos quando decorreram mais de 7 dias após a compra.

QUADRO III - HÁBITOS DE MANUSEAMENTO ANTES DE CONSUMIR OS ENCHIDOS.

Tipo de embalagem do enchido no acto da compra	%
papel	11,8
saco plástico	25,2
película de plástico aderente	22,8
em película de plástico sob vácuo	30,7
em película de plástico sob atmosfera modificada	6,3
outro	3,2
Tipo de embalagem para armazenamento em casa	%
papel	7,6
película de plástico aderente	40,2
em película de plástico sob vácuo	10,6
em película de plástico sob atmosfera modificada	3,8
folha de alumínio	13,6
caixa plástica	9,8
nenhum	14,4
Local de armazenamento em casa	%
cozinha/dispensa (12 - 30°C)	20,7
frigorífico (4 - 10°C)	79,3
Duração do armazenamento em casa até se iniciar o consumo do enchido	%
0 - 3 dias	17,8
4 - 7 dias	45,8
Mais de 7 dias	36,4

Quando consideramos os hábitos de manuseamento dos enchidos após encetado o seu consumo (Quadro IV), verifica-se que a maioria dos consumidores mantém os enchidos envoltos em película plástica aderente (42,4%) ou no interior de caixas plásticas (29,2%). 12,4% dos consumidores não guardam os enchidos encetados em qualquer embalagem, enquanto 66,7% dos inquiridos mantêm a parte remanescente do enchido que não foi consumida sob a forma de uma única

porção; 33,3% guardam-na sob a forma de fatias. A maior parte dos consumidores (89,2%) guarda os enchidos encetados num frigorífico doméstico enquanto apenas 10,8% guarda os enchidos na cozinha ou na despensa. Quase metade dos inquiridos (47,1%) demora, em média, entre 4 e 7 dias para consumir uma unidade de enchido e 31,9% mais de uma semana para consumir a mesma quantidade. Estes resultados traduzem o relativamente baixo consumo de enchidos pelos portugueses e estão de acordo com o reduzido número de unidades de enchido compradas pela população estudada, tal como se referiu no Quadro II.

QUADRO IV - HÁBITOS DE MANUSEAMENTO DEPOIS DE INICIADO O CONSUMO DO ENCHIDO.

Tipo de embalagem do enchido no acto da compra	%
papel	11,8
saco plástico	25,2
película de plástico aderente	22,8
em película de plástico sob vácuo	30,7
em película de plástico sob atmosfera modificada	6,3
outro	3,2
Tipo de embalagem para armazenamento em casa	%
papel	7,6
película de plástico aderente	40,2
em película de plástico sob vácuo	10,6
em película de plástico sob atmosfera modificada	3,8
folha de alumínio	13,6
caixa plástica	9,8
nenhum	14,4
Local de armazenamento em casa	%
cozinha/despensa (12 - 30°C)	20,7
frigorífico (4 - 10°C)	79,3
Duração do armazenamento em casa até se iniciar o consumo do enchido	%
0 - 3 dias	17,8
4 - 7 dias	45,8
Mais de 7 dias	36,4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização dos hábitos de consumo de uma população requer uma ampla recolha de informação. Estamos conscientes de que os resultados apresentados neste trabalho são uma mera aproximação à realidade, em todo o caso, parecem-nos pertinente dada a inexistência de informação sobre os hábitos de consumo de enchidos em Portugal.

O universo da amostra estudada foi composto principalmente por pessoas jovens (47,9% com idade inferior a 30 anos), do sexo feminino (61,2%), solteiras

(48,8%) e com um curso superior (62,3%). Para metade (50,4%) das pessoas inquiridas é pouco usual a compra de enchidos. Os consumidores alvo de estudo compram enchidos preferencialmente (73,1%) de tamanho médio (250 – 350 g) no supermercado (71,1%); compram até 4 unidades de enchido por mês e consomem diariamente até 4 fatias de enchido. A grande maioria dos consumidores conserva os enchidos no frigorífico doméstico, tanto antes como depois de iniciado o seu consumo; neste caso, 66,7% dos consumidores mantém numa única porção, não fraccionada portanto, a parte ainda não consumida do enchido, estando esta envolvida por película aderente (42,4%). Estes aspectos são importantes do ponto de vista higio-sanitário do produto, embora os valores da actividade da água da maioria dos nossos enchidos permita uma boa conservação à temperatura ambiente.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto “Assessment and improvement of safety of traditional dry sausages from producers to consumers (TRADISAUSAGE QLK1-CT-2002-02240).

BIBLIOGRAFIA

- Bacus, J.N., 1984. Historical perspective. In: Utilization of Microorganisms in Meat Processing. A.N. Sharpe (eds.), Research Studies Press Ltd., John Wiley & Sons Inc, New York, USA, pp. 1-14.
- Demeyer, D.I., Verplaetse, A. e Gistelink, M. 1987. Fermentation of meat: na integrated process. Proc. 33th International Congress of Meat Science and Technology, Helsinki, Finland, pp. 241-247.
- Elias, M., 2004. Caracterização, conservação e produção biotecnológica de paio de porco Alentejano. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Alimentar, Universidade de Évora.
- Fernández, J.M.B., 2000. Utilización de mohos y sus extractos enzimáticos intracelulares para potenciar la generación de substancias aromáticas y sápidas en embutidos curados. Dissertação para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Complutense de Madrid.
- Incze, K., 2000. Research priorities in fermented and dried meat products. Proc. 46th International Congress of Meat Science and Technology, Buenos Aires, Argentina, pp. 210–215.
- Sanco/4198/2001, Rev. 13. Commission regulation of on microbial criteria for foodstuffs to be complied with by food business operators. Commission of the European Communities, Working document 8.12. 2004, Brussels.

LISTERIA MONOCYTOGENES IN TURKEY MEAT UNDER MODIFIED ATMOSPHERE PACKAGING WITH GAS MIXTURES OF ARGON OR CARBON MONOXIDE

M.J. FRAQUEZA, M.C. FERREIRA e A.S. BARRETO

Faculdade de Medicina Veterinária, CIISA. Universidade Técnica de Lisboa, TU Lisbon,
Av. da Universidade Técnica, Polo Universitário, Alto da Ajuda, 1300-477 Lisboa, Portugal;
e-mail: mjoaofraqueza@fmv.utl.pt

(Recepção: 13 de Setembro de 2005; Aprovado: 15 de Outubro de 2005)

ABSTRACT

Considering the risk represented by the presence of *Listeria monocytogenes* in turkey meat under modified atmosphere packaging (MAP) conditions with a gas mixture which allows an extended shelf life of almost three weeks and a possible rough handling by consumers, our objective was to evaluate the behaviour of this pathogen in turkey meat under MAP, with argon or carbon monoxide, refrigerated (at 0 and 7 °C) and submitted to a high abuse temperature. Turkey meat samples of approximately 25 g were inoculated with 1 ml of a dilution containing 10^4 *Listeria monocytogenes* 4a CECT 934 bacteria. Inoculated samples were packaged under aerobiosis and MAP (50%N₂/50%CO₂, 50%Ar/50%CO₂, 0.5%CO/49.5%N₂/50%CO₂) and subdivided for storage at three different temperatures 20 °C, 7 °C and 0 °C. *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* spp. plate counts were performed on samples after different storage periods (1, 2, 5, 12, 19 and 25 days). The increase in *Pseudomonas* spp. counts in turkey meat under aerobiosis or MAP seems not to have interfered with *Listeria monocytogenes* growth. The inhibition of *Listeria monocytogenes* under MAP conditions with 50% CO₂ was assured only when meat samples were stored at 7 and 0 °C. *Listeria monocytogenes* did not grow at 0 °C under any package conditions, including aerobiosis. The dissolution of CO₂ in cell cytoplasm was lower at 20 °C, with the inhibition of *Listeria monocytogenes* at this temperature being less than that observed in the other storage conditions. It was, however, higher than that observed in meat under aerobiosis. Thus, close temperature control is mandatory with MAP to minimize the growth of *Listeria monocytogenes* in turkey meat.

Key words: argon, carbon monoxide, *Listeria monocytogenes*, MAP, safety, turkey meat

COMPORTAMENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* NA CARNE DE PERU EMBALADA EM ATMOSFERA MODIFICADA COM MISTURAS DE GASES CONTENDO ARGON OU MONÓXIDO DE CARBONO

RESUMO

Atendendo ao risco que pode representar a presença de *Listeria monocytogenes* na carne de aves embalada em atmosfera modificada (MAP), com misturas de gases que podem prolongar o período de validade até às três semanas e a má manipulação que o consumidor pode fazer destas embalagens, foi nosso objectivo estudar o comportamento deste patogénico na carne de peru embalada com misturas de gases contendo Ar (50% Ar e 50% CO₂) ou CO (0,5% CO, 49,5% N₂ e 50% CO₂), em refrigeração (0 e 7 °C) e sob efeito de uma temperatura abusivamente elevada. Assim, inoculou-se 1 ml duma diluição veiculando cerca de 10⁴ bactérias de *Listeria monocytogenes* 4a CECT 934, na superfície de amostras de carne de peru (escalopes), com aproximadamente 25 g. As amostras inoculadas foram embaladas em aerobiose e em MAP (50%N₂/50%CO₂, 50%Ar/50%CO₂, 0,5%CO /49,5%N₂/50%CO₂) sendo, posteriormente, subdivididas para armazenamento sob três regimes de temperatura diferentes 20, 7 e 0 °C. Foram efectuadas contagens de *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. às amostras em diferentes dias de armazenamento (1º, 2º, 5º, 12º, 19º e 25º dias). O crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em aerobiose ou em MAP não parece ter interferido com o crescimento de *L. monocytogenes*. A inibição do crescimento de *L. monocytogenes* quando sujeita às diferentes atmosferas modificadas em estudo contendo concentrações de 50% de CO₂, é garantida apenas quando a carne é armazenada a temperaturas de 7 e 0 °C. A 0 °C *L. monocytogenes* não cresceu em qualquer uma das condições de embalagem inclusive em aerobiose. A 20 °C a dissolução do CO₂ no citoplasma é menor, pelo que a inibição de *L. monocytogenes* foi menor do que a observada nas outras temperaturas. Não obstante, foi superior à observada na carne embalada em aerobiose. Confirma-se assim a importância do controlo da temperatura, em conjunto com a embalagem MAP para limitar o crescimento de *L. monocytogenes* na carne de peru.

Palavras-chave: argon, carne de peru, embalagem em atmosfera modificada, *Listeria monocytogenes*, monóxido de carbono, segurança

INTRODUÇÃO

Na carne de aves fresca é comum o aparecimento de *Listeria monocytogenes* (Jay, 1996; Ojeniyi *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 2000; Miettinen *et al.*, 2001; Gudbjörnsdóttir *et al.*, 2004), um dos principais patogénicos emergentes para o

Homem (McLauchlin, 1996; Lessing *et al.*, 1994), uma vez que se trata de uma bactéria ubiquitária, psicrotrófica, habitualmente presente no ambiente fabril (Chasseignaux *et al.*, 2002).

Em Portugal, os estudos de frequência do género *Listeria* spp. em carne de aves apresentam resultados que variaram entre 30 a 100%, com valores de prevalência de *L. monocytogenes* entre 12 a 60% (Antunes *et al.*, 2000; Fraqueza *et al.*, 2002; Guerra e Bernardo, 2002; Guerra, 2002; Mena *et al.*, 2004). A presença deste patogénico na carne é menos preocupante do que nos alimentos prontos a consumir devido ao facto de ser sujeita a preparação culinária com aquecimento letal antes de ser consumida. Todavia, não deve ser desprezada a sua importância como recontaminante, devido ao facto de crescer a temperaturas de refrigeração, podendo aumentar de menos de 100 células/g (em muitos países considerado o valor máximo aceitável para pessoas saudáveis), para mais de 100 000 células/g durante um período de 3-4 semanas, o período de validade de muitos alimentos mantido em refrigeração (Miettinen *et al.*, 1999).

Assim, o risco ligado ao consumo de carne de peru contaminada por *L. monocytogenes* depende da presença e do número de bactérias, aliado à possibilidade do seu crescimento em função das características físico-químicas do alimento, da temperatura e da duração do período de conservação/armazenamento que poderá ser alargado com a embalagem MAP. Neste contexto, têm sido efectuados estudos de comportamento de *L. monocytogenes* sujeita a vários factores como pH, aw, NaCl, nitritos, temperatura, atmosferas modificadas com concentrações crescentes de CO₂, com o objectivo de prever a evolução da população. Outros factores podem influenciar o crescimento, nomeadamente o número inicial, o estado fisiológico da estirpe, interacções com flora competitiva (Farber *et al.*, 1996; Begot *et al.*, 1997; Harrison, 2000; Robison *et al.*, 2001; Pin *et al.*, 2001; François *et al.*, 2004). Cada alimento tem características intrínsecas próprias que, associadas aos factores extrínsecos conferidos pelo processo tecnológico, influenciam o crescimento. Por isso, surgem recomendações da Comunidade Europeia na realização de testes de crescimento de *L. monocytogenes* nos alimentos para avaliação do risco que representa, impondo para objectivo que a concentração de *L. monocytogenes* nos alimentos produza contagens inferiores a 100 ufc.g⁻¹ (Regulamento CE, Nº 2073/2005). Os testes de crescimento permitem estudar a evolução duma população de microrganismos patogénicos introduzida num alimento, sendo um dos utensílios disponíveis para a avaliação do risco de doença causada pela ingestão dum alimento contaminado (Uyttendaele *et al.*, 2004).

Atendendo ao risco que pode representar a presença deste patogénico na carne de aves embalada em MAP, com misturas de gases que podem prolongar o período de validade até às três semanas e a má manipulação que o consumidor pode fazer destas embalagens foi nosso objectivo estudar o comportamento de *L. monocytogenes* na carne de peru embalada com misturas de gases contendo Ar (50% Ar e 50% CO₂) ou CO (0,5% CO, 49,5% N₂ e 50% CO₂) armazenada em refrigeração a 0 e a 7 °C ou sob efeito de uma temperatura elevada.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras foram retiradas de carcaças de peru abatidos de acordo com as condições comerciais de abate num matadouro industrial. A carne fatiada foi colocada em saco de polietileno e transportada em caixa isotérmica em menos de uma hora para o laboratório.

Estirpe utilizada

Utilizou-se uma estirpe pura de *L. monocytogenes* 4a CECT 934 conservada a 4 °C no meio de TSA (Tryptona Soja Agar, Oxoid, Inglaterra). Esta cultura foi renovada mensalmente. Antes de ser utilizada para os ensaios de inoculação procedeu-se à repicagem da estirpe em tubos de BHI (Brain Heart Infusion; Sharlau, Espanha) com um período de incubação de 24 h a 37 °C, duas vezes consecutivas. Efectuou-se de seguida a sementeira por estria em placas de TSA durante 24 h a 37 °C.

Preparação da suspensão de *Listeria monocytogenes* e inoculação da carne

Utilizou-se uma cultura de 24 h de *L. monocytogenes* em TSA na preparação de suspensões bacterianas em água tamponada fosfatada¹ de forma a obter uma absorvância de aproximadamente 0,340 A, medida num espectrofotómetro UV/Visible Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Inglaterra) a 625 nm. A estes valores de absorvância da suspensão (suspensão-inicial) corresponderam contagens médias de aproximadamente 10⁷ ufc.ml⁻¹, conferidas utilizando a técnica de sementeira das suas diluições decimais em meio TSA, seguida de incubação de

¹ Solução tampão de fosfato de potássio dihidrogenado, pH 7,2 a 0,3mM, contendo 1mM de sulfato de magnésio (Jensen *et al.*, 1978).

24-48 h a 37 °C. A suspensão inicial foi diluída a 10^{-3} e inoculou-se 1ml desta diluição veiculando cerca de 10^4 bactérias, na superfície de amostras de carne de peru com aproximadamente 25 g, isentas deste patógeno (mediante pesquisa). Foram efectuadas contagens de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. às amostras de carne logo após inoculação.

Condições de embalagem e armazenamento

As amostras inoculadas foram embaladas em aerobiose, utilizando barquetes de polipropileno rígido (Tecknopack plastics, S/L, Barcelona) envolvidas por filme de polivinilo permeável ao oxigénio e em MAP. Constituíram-se quatro grupos diferentes: aerobiose, 50%N₂/50%CO₂ (MAP-N₂/CO₂), 50%Ar/50%CO₂ (MAP-Ar/CO₂), 0,5%CO /49,5%N₂/50%CO₂ (MAP-CO/N₂/CO₂) sendo, posteriormente, subdivididas para armazenamento sob três regimes de temperatura diferentes 20, 7 e 0 °C (Fig. 1).

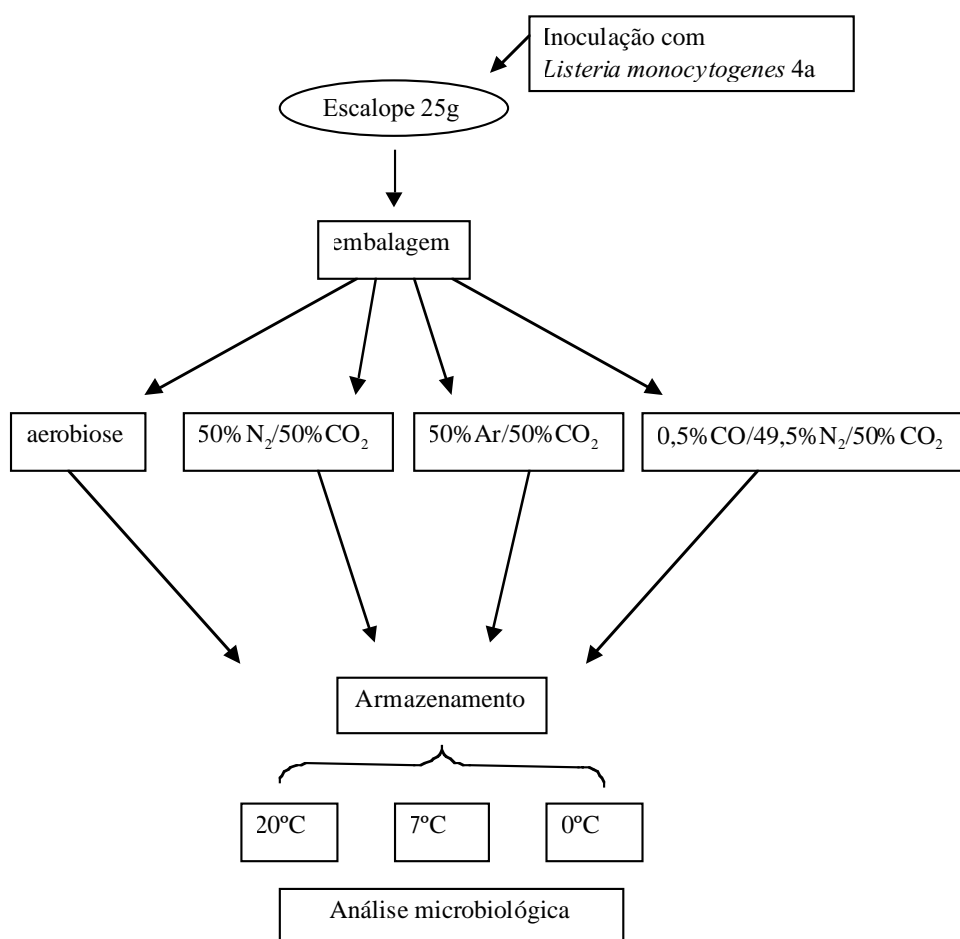


Figura 1. Protocolo do estudo de desafio efectuado na carne de peru fatiada e embalada em aerobiose e MAP.

Nas embalagens da carne em atmosfera modificada utilizaram-se barquetes de polipropileno rígido e sacos polilaminados "HBX-070" (R.Bayer, Alemanha) de alta impermeabilidade ao O₂ e CO₂ (permeabilidade: O₂=8,3 cm³, CO₂=23 cm³, N₂=3 cm³ e ao vapor de água=1,3 cm³). Os sacos foram termosoldados numa máquina EVT-7-CD Tecnotrip (Barcelona) após obter um vazio de 97%, seguido de uma entrada de gás de 60%.

As amostras embaladas que permaneceram a 20 °C foram analisadas após 24 e 48 h de armazenamento. Nas amostras embaladas em aerobiose e armazenadas a 7 °C, o período de armazenamento foi de cinco dias, enquanto nas armazenadas a 0 °C o período de armazenamento estendeu-se até aos 12 dias, efectuando-se análises ao 5º e 12º dia.

As amostras embaladas em MAP e armazenadas a 20 °C foram analisadas após 24 e 48 h, enquanto nas outras temperaturas de armazenamento realizaram-se análises aos 5º, 12º, 19º e 25º dias de armazenamento. Efectuaram-se no mínimo duas repetições do protocolo descrito para cada período de armazenamento.

Análise microbiológica

Preparação da amostra e diluições

A preparação das amostras foi efectuada segundo as recomendações da NP 2079 (1989). A partir da suspensão-mãe efectuaram-se diluições decimais segundo a Norma Portuguesa-3005 (NP-3005, 1985).

Contagem de *Pseudomonas* spp.

Sementeira de 0,1 ml de cada diluição à superfície do meio de cultura CFC (cefaloridina, fucidina e cetricimida agar base; Oxoid, Inglaterra), em quintuplicado, tendo-se efectuado a contagem de colónias após incubação a 30 °C durante 48 h (Mead e Adams, 1977). Os resultados foram expressos em log ufc.g⁻¹.

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para pesquisa de *L. monocytogenes* realizou-se inicialmente, a partir de 25 g de amostra de carne preparada assepticamente, um enriquecimento nos meios de Fraser I e Fraser II (Merck, Alemanha) incubados durante 24 h, respectivamente a 30 e 37 °C.

O isolamento foi efectuado a partir dos meios de enriquecimento mediante sementeira por estria à superfície do Modified Oxford Medium (Difco), seguido de incubação a 37 °C durante 24 a 48 h (ISO/DIS 11290-1, 1995).

Para confirmação das colónias suspeitas de *L. monocytogenes* foi efectuada repicagem para meio TSA seguida de incubação de 24 h a 37 °C. Efectuou-se o estudo por transiluminação de Henry das colónias que cresceram em TSA; nas que apresentaram uma luminescência azul efectuaram-se testes da catalase e oxidase. Para identificação e confirmação utilizaram-se os testes bioquímicos miniaturizados APIListeria (Biomerieux, França) a partir de colónias catalase positivas e oxidase negativas.

Contagem de *Listeria monocytogenes*

Sementeira em duplicado de 0,1 ml da suspensão-mãe por espalhamento à superfície do meio de cultura Modified Oxford Medium (Difco), seguida de contagem de colónias suspeitas após incubação a 37 °C, durante 24 a 48 h. Confirmação de *L. monocytogenes* de acordo com o procedimento descrito na pesquisa deste microrganismo. Os resultados foram expressos em log ufc.g⁻¹.

Análise estatística

A comparação do crescimento de *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. ao longo do tempo sob diferentes condições de embalagem e de temperatura de armazenamento foi efectuada pelo ajuste das respectivas rectas de regressão linear simples ($y=a+bx$) quando significativas e estabeleceu-se uma estratégia de análise de covariância. Previamente tentou-se estabelecer modelos de regressão quadrática, não linear, com a função $y=a+bx+cx^2$ mas não foram significativos. A estratégia de análise de covariância dos modelos de regressão linear foi efectuada de acordo com as etapas referidas em Littell *et al.* (1996) utilizando-se o programa SAS System. Efectuou-se o cálculo da taxa de crescimento entre dois tempos de armazenamento (diferença entre os valores obtidos na contagem de microrganismos em log ufc.g⁻¹ (Δy) em dois pontos de análise nos tempos a e b) através da equação $\Delta y_{a-b}/\Delta t_{a-b}$, em que Δt_{a-b} é a diferença de tempo em dias entre tempos a e b, e apresentação das respectivas médias e desvios padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises das amostras de carne de peru utilizadas neste estudo provaram a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g. No Quadro I estão representados os teores médios de *L. monocytogenes* nos escalopes de peru

inoculados e embalados em aerobiose e MAP com as misturas 0,5%CO/49,5%N₂/50%CO₂, 50%N₂/50%CO₂ e 50%Ar/50%CO₂ armazenados a 20, 7 e 0°C.

O crescimento de *L. monocytogenes* apresentou uma relação linear com o tempo significativa, quando a carne de peru embalada nas diferentes condições de estudo esteve exposta a uma temperatura abusiva de 20 °C (Fig. 2A). As regressões lineares entre os teores de *Pseudomonas* spp. e o tempo de armazenamento na carne embalada em aerobiose e MAP a 20 °C estão representadas na Fig. 2B.

No Quadro II apresentam-se as rectas de regressão linear estabelecidas para *L. monocytogenes* e *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em aerobiose e MAP mantida a 20 °C.

Quadro I - TEORES MÉDIOS E DESVIOS PADRÃO DE *Listeria monocytogenes* NA CARNE EMBALADA EM AEROBIOSE E MAP AO LONGO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO A 0, 7 E 20 °C.

		<i>Listeria monocytogenes</i> (log ufc.g ⁻¹)						
Embalagem	Temp. (°C)	dias						
		0	1	2	5	12	19	25
Aerobiose	20	4,06±1,08	8,27±0,30	8,32±0,07				
	7	4,06±1,08			6,58±1,22			
	0	4,06±1,08			3,99±1,59	5,52±0,44		
MAP-CO/N ₂ /CO ₂	20	4,06±1,08	5,97±0,98	6,79±1,68				
	7	4,06±1,08			4,75±0,94	4,39±1,12	4,95	4,95±0,91
	0	4,06±1,08			4,05±1,32	3,56±1,64	5,06	4,01±1,18
MAP-N ₂ /CO ₂	20	4,06±1,08	6,65±0,89	7,67±0,06				
	7	4,06±1,08			4,85±1,00	5,11±1,32	6,66±1,83	5,62±1,74
	0	4,06±1,08			3,87±1,26	3,94±1,34	4,89±0,13	3,85±1,35
MAP-Ar/CO ₂	20	4,15±1,31	6,43±1,14	7,17±1,03				
	7	4,15±1,31			5,60±0,57	6,01±1,34	5,71±1,35	5,88±1,39
	0	4,15±1,31			5,10±0,01	5,04±0,06	5,25±0,10	5,07±0,09

* temperatura

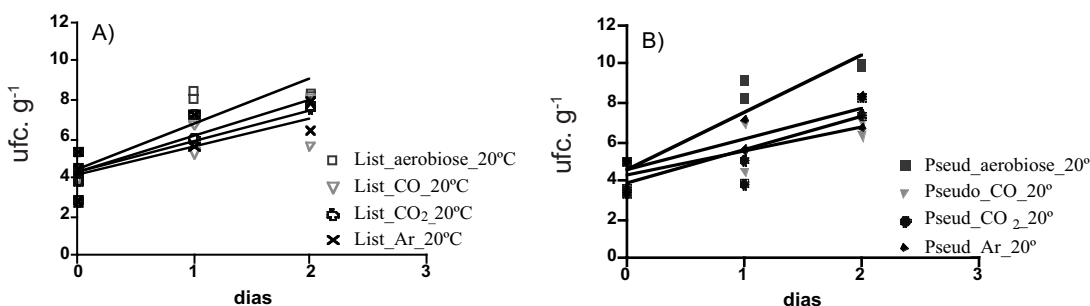


Figura 2. Rectas de regressão linear representando o crescimento de *Listeria monocytogenes* (A) e *Pseudomonas* spp. (B) na carne de peru embalada em aerobiose e MAP durante 2 dias a 20 °C.

Quadro II - RECTAS DE REGRESSÃO LINEAR MODELOS DE CRESCIMENTO DE *Listeria monocytogenes* E DE *Pseudomonas* spp. NA CARNE DE PERU EMBALADA EM MAP E EM AEROBIOSE DURANTE 2 DIAS A 20 °C.

Tipo de embalagem	<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pseudomonas</i> spp.	
	Rectas de regressão	R ²	Rectas de regressão	R ²
aerobiose	y=2,32x+4,44	0,7488	y=3,01x+4,52	0,8804
0,5%CO/49,5%N ₂ /50%CO ₂	y=1,41x+4,16	0,5868	y=1,23x+4,27	0,5844
50%N ₂ /50%CO ₂	y=1,87x+4,21	0,7873	y=1,67x+3,93	0,6787
50%Ar/50%CO ₂	y=1,56x+4,33	0,6395	y=1,58x+4,53	0,7284

Quando se utilizou a metodologia de covariância para comparar a evolução de *L. monocytogenes* em diferentes condições de embalagem, verificou-se que não existem diferenças significativas ($p=0,575$) entre os declives das diferentes rectas de regressão ajustadas aos valores de crescimento de *L. monocytogenes* na carne embalada em aerobiose e MAP, quando armazenada a 20 °C, pelo que foi possível calcular um declive único para todos os resultados igual a 1,796.

A 0 e 7 °C, independentemente da condição de embalagem MAP utilizada, a população de *L. monocytogenes* na carne não aumentou ao longo dum período de armazenamento de 25 dias, não se estabelecendo qualquer relação linear significativa entre o crescimento microbiano e o tempo de armazenamento das amostras. Contudo, esta relação linear foi encontrada para *Pseudomonas* spp. na carne embalada e armazenada a 7 °C (Fig. 3), resumindo-se no Quadro III as rectas de regressão estabelecidas para as diferentes condições de embalagem da carne. A influência do efeito da embalagem com as atmosferas 0,5%CO/49,5%N₂/

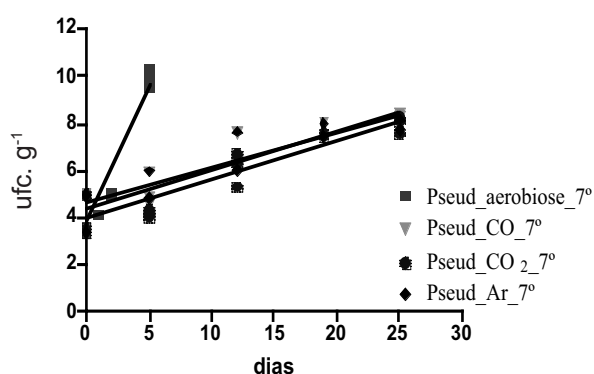


Figura 3. Rectas de regressão linear representando o crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em MAP e em aerobiose durante 25 dias a 7 °C.

Quadro III - RECTAS DE REGRESSÃO LINEAR MODELOS DE CRESCIMENTO DA *Pseudomonas* spp. NA CARNE DE PERU EMBALADA EM MAP E EM AEROBIOSE DURANTE 2 DIAS A 7°C.

<i>Pseudomonas</i> spp. 7 °C	Rectas de regressão	R ²
aerobiose	y=1,15x+3,87	0,9135
0,5%CO/49,5%N ₂ /50%CO ₂	y=0,17x+4,37	0,8560
50%N ₂ /50%CO ₂	y=0,17x+3,96	0,8638
50%Ar/50%CO ₂	y=0,15x+4,64	0,8134

50%CO₂, 50%N₂/50%CO₂ e 50%Ar/50%CO₂ sobre o crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru ao longo do tempo de armazenamento é significativamente diferente (p<0,0001) do observado na carne embalada em aerobiose, tal como se observou pelas diferenças encontradas nos declives das rectas de regressão ajustadas em cada condição de embalagem.

Quando a carne de peru foi armazenada a 0 °C, a relação linear entre o teor de *Pseudomonas* spp. e o tempo de armazenamento das amostras embalada em aerobiose foi significativa, ajustando-se a recta de regressão que está representada na Fig. 4 e Quadro IV. As atmosferas 0,5%CO/49,5%N₂/50%CO₂, 50%N₂/50%CO₂ e 50%Ar/50%CO₂ inibiram o crescimento de *L. monocytogenes* e da flora de deterioração representada pelas *Pseudomonas* spp. quando a carne foi

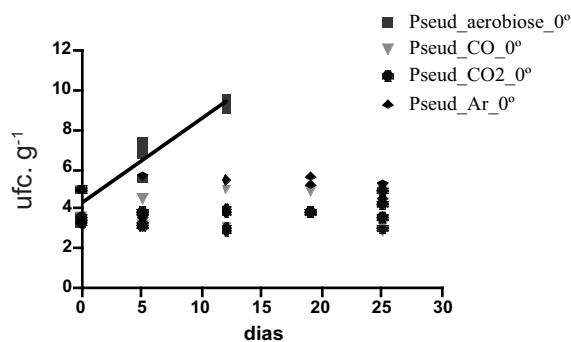


Figura 4. Rectas de regressão linear representando o crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em MAP e em aerobiose durante 25 dias a 0 °C.

Quadro IV - RECTA DE REGRESSÃO LINEAR MODELO DE CRESCIMENTO DA *Pseudomonas* spp. NA CARNE DE PERU EMBALADA EM MAP E EM AEROBIOSE DURANTE 2 DIAS A 0 °C.

<i>Pseudomonas</i> spp. 0 °C	Rectas de regressão	R ²
aerobiose	y=0,43x+4,37	0,8733

armazenada a 0 °C, não se observando um aumento do teor destes microrganismos ao longo do tempo de armazenamento.

O crescimento da população de *L. monocytogenes* na carne foi acentuado nas diferentes condições de embalagem a 20 °C (Fig. 2). Apesar da análise de covariância não registrar diferenças significativas no comportamento de *L. monocytogenes* quanto ao efeito inibitório das misturas gasosas contendo CO₂ comparativamente com a embalagem em aerobiose, pode-se verificar que a taxa de crescimento médio de *L. monocytogenes* a 20 °C foi mais elevada na carne embalada em aerobiose (3,41 log ufc.dia⁻¹) nas primeiras 24 h, do que nas condições de embalagem MAP que apresentaram valores entre 1,12 e 1,79 log ufc.dia⁻¹ (Quadro V).

Quadro V. TAXAS DE CRESCIMENTO MÉDIO DE *Listeria monocytogenes* NA CARNE EMBALADA EM AEROBIOSE E MAP AO LONGO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO A 0, 7 E 20 °C.

		<i>Listeria monocytogenes</i>						
Embalagem	Temp.* (°C)	log ufc.dia ⁻¹						
		$\Delta y_{0-1}/\Delta t_{0-1}$	$\Delta y_{1-2}/\Delta t_{1-2}$	$\Delta y_{0-5}/\Delta t_{0-5}$	$\Delta y_{0-12}/\Delta t_{0-12}$	$\Delta y_{0-19}/\Delta t_{0-19}$	$\Delta y_{0-25}/\Delta t_{0-25}$	$\Delta y_{5-25}/\Delta t_{5-25}$
Aerobiose	20	3,41±0,37	0,05±0,23					
	7			0,42±0,14				
	0			-0,02±0,14	0,06±0,02			
MAP- CO/N ₂ /CO ₂	20	1,12±0,31	0,82±0,70					
	7			0,05±0,16	-0,02±0,00	-0,02	-0,00±0,01	-0,01±0,03
	0			-0,00±0,12	-0,03±0,03	-0,01	-0,00±0,01	-0,00±0,02
MAP- N ₂ / CO ₂	20	1,79±0,22	1,02±0,96					
	7			0,07±0,11	0,05±0,05	-0,00±0,18	0,05±0,04	0,04±0,05
	0			-0,04±0,12	-0,01±0,04	-0,09±0,10	-0,01±0,02	-0,00±0,01
MAP- Ar/ CO ₂	20	1,58±0,47	0,74±0,11					
	7			0,15±0,02	0,10±0,06	0,05±0,04	0,04±0,03	0,01±0,04
	0			0,05±0,14	0,02±0,06	0,02±0,03	0,01±0,03	-0,00±0,00

* temperatura

Simultaneamente, verificou-se que a carne armazenada em aerobiose poderá apresentar sinais de deterioração no termo das 24 h devido ao rápido crescimento da população de *Pseudomonas* spp. que apresentou uma taxa de crescimento específica significativamente mais elevada (3,01 log ufc.d⁻¹), que a observada nas restantes condições de embalagem (Quadro II). Por outro lado, nas condições de embalagem MAP os sinais de deterioração da carne poderão não ser tão evidentes, enquanto o crescimento de *L. monocytogenes* pode chegar perto dos 100 ufc.g⁻¹.

A 20 °C não se observaram diferenças significativas do efeito dos gases Ar e CO comparativamente à mistura gasosa contendo apenas 50% de CO₂ quer

em relação ao crescimento de *L. monocytogenes*, quer em relação ao crescimento de *Pseudomonas* spp.. Nas amostras armazenadas a 20 °C observou-se um efeito inibitório do CO₂, presente na mistura de gases com uma concentração de 50%, sobre a *Pseudomonas* spp., uma vez que o efeito repressivo de qualquer das misturas com esta concentração de CO₂ é significativamente superior ($p=0,04516$) ao observado na carne embalada em aerobiose (Fig. 2B). O efeito inibitório do CO₂ aumentou significativamente com a diminuição da temperatura a 7 °C em qualquer das misturas utilizadas ($p<0,00041$).

A 7 °C não ocorreu crescimento de *L. monocytogenes* na carne de peru em qualquer das embalagens MAP. Este patogénico apresentou uma taxa de crescimento média inferior a 0,05 log ufc.dia⁻¹, entre os 0 e 25 dias de armazenamento (Quadro V). Apenas as amostras embaladas em aerobiose, registaram uma taxa média de crescimento de *L. monocytogenes* de 0,42 log ufc.dia⁻¹ ao fim de cinco dias de armazenamento a 7 °C, observando-se no mesmo período um aumento de *Pseudomonas* spp. com uma taxa de crescimento específico de 1,15 log ufc.dia⁻¹. Assim, quando ocorre um aumento de *Listeria monocytogenes* para 100 ufc.g⁻¹ a carne pode apresentar teores em *Pseudomonas* spp. superiores a 8 log ufc.g⁻¹, acompanhada de sinais de deterioração evidenciados por mau cheiro e viscosidade, que levará à sua rejeição pelos consumidores. Salienda-se que esta análise é efectuada partindo do pressuposto de que as taxas de crescimento calculadas são constantes durante os cinco dias de armazenamento e que a densidade populacional máxima de *L. monocytogenes* na matriz sólida foi de aproximadamente 10⁸ ufc.g⁻¹, tal como se observou nas amostras embaladas em aerobiose a 20 °C.

A inibição do crescimento de *L. monocytogenes* quando sujeita às diferentes atmosferas modificadas em estudo contendo concentrações de 50% de CO₂, é garantida apenas quando a carne é armazenada a temperaturas de 7 e 0 °C. A 0 °C *L. monocytogenes* não cresceu em qualquer uma das condições de embalagem, inclusive em aerobiose.

A 20 °C a dissolução do CO₂ no citoplasma é menor, pelo que a inibição de *L. monocytogenes* foi menor do que a observada nas outras temperaturas. Não obstante, foi superior à observada na carne embalada em aerobiose. Confirma-se, assim, a importância do controlo da temperatura em conjunto com a embalagem MAP para limitar o crescimento de *L. monocytogenes*. De acordo com Farber *et al.* (1996), os resultados do estudo que efectuaram sobre modelização do

crescimento de *L. monocytogenes* demonstraram a importância do controlo de temperatura para garantir e manter as vantagens da extensão do período de vida dos alimentos embalados com atmosferas enriquecidas de CO₂. As fases lag e tempo de geração de *L. monocytogenes* aumentam quando a concentração de CO₂ aumenta e o pH e a temperatura diminuem. Durante um período de 30 dias a pH 5,5 o microrganismo foi incapaz de crescer a 4 °C na presença de concentrações de CO₂ ≥ 50% aumentando a sua taxa de crescimento quando a temperatura aumentou para 7 °C.

Bennik *et al.* (1995) registaram uma inibição da população de *L. monocytogenes* quando submetida a uma concentração de CO₂ de 50%, como resultado do efeito de uma acidificação do meio pelo CO₂, mas também dum efeito inibitório directo. A difusão de H₂CO₃ através da membrana bacteriana causa alterações do pH intracelular, com efeito nas enzimas envolvidas nas vias metabólicas. Elevadas concentrações de CO₂ podem inibir as reacções de descarboxilação nas quais o CO₂ é libertado por mecanismos de *feedback*.

São vários os factores intrínsecos que influenciam o crescimento de *L. monocytogenes* nos alimentos, tais como pH e aw, independentemente do efeito de misturas de gases contendo CO₂ e da temperatura de armazenamento. Assim, o estudo do crescimento do microrganismo patogénico no próprio alimento é de grande importância para avaliação do risco, tanto mais que este pode ser influenciado pela competição existente com a própria flora de deterioração. O crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em aerobiose ou em MAP não parece ter interferido com o crescimento de *L. monocytogenes*. Buchanan *et al.* (1999) concluíram que microrganismos de deterioração como *Pseudomonas fluorescens* quando partilham um ambiente com um patogénico como *L. monocytogenes*, tanto pode não ter qualquer influência, como estimular ou inibir a velocidade ou a extensão do crescimento da espécie patogénica, dependendo das condições ambientais.

Quando analisado o crescimento de *L. monocytogenes* em “nuggets” de frango embalado em atmosferas de 100% de CO₂ verificou-se que a 4 e 12 °C houve apenas um atraso, mas não uma inibição do crescimento deste microrganismo (Lyver *et al.*, 1998).

Hart *et al.* (1991) estudaram o crescimento de *L. monocytogenes* em peitos de frango armazenados a 1, 6 e 15 °C sob diferentes condições de embalagem em atmosfera modificada: a 1 °C este patogénico não cresceu em qualquer das misturas de gases assim como em aerobiose; a 6 °C cresceu lentamente na atmosfera de

30% de CO₂ preenchida com N₂ enquanto não cresceu nas atmosferas de 30% de CO₂ e preenchida com ar ou de 100% de CO₂ durante os 15 dias de armazenamento.

Wimpfheimer *et al.* (1990) concluíram que numa atmosfera de 75% de CO₂ e 25% N₂ *L. monocytogenes*, tal como outras bactérias aeróbias, não cresceu em carne de frango armazenada a 4, 10 ou 27 °C. Contudo, numa atmosfera contendo 5% de O₂, 72,5% de CO₂ e 22,5% N₂, a 4°C, o número de *L. monocytogenes* aumentou aproximadamente 6 log durante um período de armazenamento de 21 dias.

Farber e Daley (1994) observaram que *L. monocytogenes* foi capaz de crescer em rolos de carne de peru embalados com misturas contendo 50% de CO₂. A estirpe *L. monocytogenes* Scott A não cresceu nos rolos de carne de peru embalados em atmosferas de 70% CO₂ e 30% N₂ armazenados a 4 ou a 10 °C.

O efeito do 0,5% de CO na mistura 50% CO₂ e 49,5% N₂ não induziu um efeito inibitório no crescimento de *L. monocytogenes*, para além do observado com a concentração de 50% de CO₂ na mistura com 50% de N₂. A baixas temperaturas (7 e 0°C) não se registou crescimento de *L. monocytogenes*, enquanto a 20 °C o crescimento do patogénico deu origem a um aumento de 1,12 log ufc em 24 h. Nos estudos efectuados por Nissen *et al.* (2000) em carne de vaca embalada com misturas contendo elevadas concentrações de CO₂ (60%) e 0,4% de CO, o crescimento de *L. monocytogenes* a 4 °C foi inibido, enquanto a 10 °C ocorreu um aumento ligeiro de 5x10³ ufc.g⁻¹ para 10⁴ ufc.g⁻¹ após 5 dias de armazenamento tal como foi avaliado pela subcultura. Os autores atribuíram o efeito inibitório registado às elevadas concentrações de CO₂.

As misturas de gases nas embalagens MAP constituem mais uma barreira no crescimento de alguns microrganismos patogénicos como *L. monocytogenes* na carne de peru, sendo fundamental a existência dum sistema de controlo proactivo (HACCP), de modo a garantir a aplicação de boas práticas de higiene e processamento, assim como o controlo adequado da temperatura durante o processo de abate, desmancha, embalamento, armazenamento, distribuição e venda, que se afirme um ponto crítico de controlo.

CONCLUSÕES

O crescimento de *Pseudomonas* spp. na carne de peru embalada em aerobiose ou em MAP não parece ter interferido com o crescimento de

L. monocytogenes. A inibição do crescimento de *L. monocytogenes* quando sujeita às diferentes atmosferas modificadas em estudo contendo concentrações de 50% de CO₂, é garantida apenas quando a carne é armazenada a temperaturas de 7 e 0 °C. A 0 °C *L. monocytogenes* não cresceu em qualquer uma das condições de embalagem inclusive em aerobiose. A 20 °C a dissolução do CO₂ no citoplasma celular é menor pelo que a inibição de *L. monocytogenes* é menor do que a observada em outras temperaturas sendo não obstante superior à observada na carne embalada em aerobiose. Confirma-se assim, a importância do controlo da temperatura em conjunto com a embalagem MAP para limitar o crescimento de *L. monocytogenes*.

AGRADECIMENTOS

Expressamos o nosso agradecimento às técnicas Maria Helena Fernandes e Paula Carapinha dos Santos pelo apoio laboratorial prestado.

BIBLIOGRAFIA

- Antunes, P., Réu, C., Sousa, J.C., Peixe, L. e Pestana, N., 2000. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. isolated from poultry products. Congresso Food Safety. Fundação Engº António de Almeida, Porto, pp. 95.
- Begot, C., Lebert, I. e Lebert, A., 1997. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. Food Microbiology, 14: 403-412.
- Bennik, M.H.J., Smid, E.J., Rombouts, F.M. e Gorris, L.G.M., 1995. Growth of psychrotrophic foodborne pathogens in a solid surface model system under the influence of carbon dioxide and oxygen. Food Microbiology, 12: 509-519.
- Buchanan, R.L. e Bagi, L.K., 1999. Microbial competition: effect of *Pseudomonas fluorescens* on the growth of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology, 16: 523-529.
- Chasseignaux, E., G rault, P., Toquin, M.-T., Salvat, G., Colin, P. e Ermel, G., 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. FEMS Microbiology Letters, 210: 271-275.
- Farber, J.M., Cai, Y. e Ross, W.H., 1996. Predictive modeling of the growth of *Listeria monocytogenes* in CO₂ environments. Int. J. Food Microbiology, 32: 133-144.
- Farber, J.M. e Daley, E., 1994. Fate of *Listeria monocytogenes* on modified atmosphere packaged turkey roll slices. J. Food Protection, 57: 12, 1098-1100.
- François, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. e Debevere, J., 2005. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. International J. Food Microbiology, 100: 41-53.

- Fraqueza, M.J., Ferreira, M.F. e Barreto, A.S., 2002. Packaged sliced turkey meat on commercial conditions: incidence of *Listeria* spp. and total aerobic flora evaluation. Congresso Food Safety, Fundação Engº António de Almeida, Porto, pp. 102.
- Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M.-L., Gustavsson, P., Thorkelsson, G., Salo, S., Sjöberg Niclasen, O. e Bredholt, S., 2004. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the nordic countries. *Food Microbiology*, 21: 217-225.
- Guerra, M.M., 2002. Heterogeneidade feno e genotípica de *Listeria monocytogenes*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina Veterinária, UTL, Lisboa, 279 p.
- Guerra, M.M. e Bernardo, F.M.A., 2002. Detection and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates in poultry and meat products. Congresso Food Safety. Fundação Engº António de Almeida, Porto, pp.63.
- Harrison, W.A., Peters, A.C. e Fielding, L.M., 2000. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* colonies under modified atmospheres at 4º and 8 ºC using a model food system. *J. Applied Microbiology*, 88: 38-43.
- Hart, C.D., Mead, G.C. e Norris, A.P., 1991. Effects of gaseous environment and temperature on the storage behavior of *Listeria monocytogenes* on chicken breast meat. *J. Appl. Bacteriology*, 70: 40-46.
- Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Kokubo, Y., Marayama, T., Saito, A., Yoshida, T., Terao, M., Yamamoto, S. e Kumagai, S., 2000. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. *Int. J. Food Microbiol.*, 59: 73-77.
- International Standard ISO/DIS 11290-1 (1995). Microbiologie des Aliments- Methode horizontale pour la recherche et le denombrement de *Listeria monocytogenes*. International Organization for Standardization, Switzerland.
- Jay, J., 1996. Prevalence of *Listeria* spp. *In*: Meat and poultry products. *Food Control*, 7: 209-214.
- Jensen, J.P., Huhtanen, C.N. e Bell, R.H., 1978. Culture media and preparation. *In*: Standard Methods for Examination of Dairy Products, Marth, E.H. (Ed.). American Public Health Association, Washington, DC, p. 62.
- Lessing, M.P.A., Curtis, G.D.W. e Bowler, I.C.J., 1994. *Listeria ivanovii* infection. *J. Infect.*, 29: 230-231.
- Littell, R.C., Milliken, G.A., Stroup, W.W. e Wolfinger, R.D., 1996. SAS[®] System for mixed models, Cary, NC: SAS Institute Inc., p.176.
- Lyver, A., Smith, J.P., Tarte, I., Farber, J.M. e Nattress, F.M., 1998. Challenge studies with *Listeria monocytogenes* in a value-added seafood product stored under modified atmospheres. *Food Microbiology*, 15: 379-389.
- McLauchlin, J., 1996. The relationship between *Listeria* and Listeriosis. *Food Control*, 7: 187-193.
- Mead, G.C. e Adams, B.W., 1977. A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. *British Poultry Science*, 18: 661-70.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T. e Gibbs, P.A., 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21: 213-216.

- Miettinen, M.K., Björkroth, K. e Korkeala, H.J., 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from ice cream plant by serotyping and pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiology*, 46: 187-192.
- Miettinen, M.K., Palmu, L., Björkroth, K.J. e Korkeala, H.J., 2001. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant and retail level. *J. Food Protection*, 64: 994-999.
- Nissen, H., Alvseike, O., Bredholt, S., Holck, A. e Nesbakken, T., 2000. Comparison between the growth of *Listeria enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* in ground beef packed by three commercially used packaging techniques. *Int. J. Food Microbiology*, 59: 211-220.
- Norma Portuguesa NP-2079 (1989). Microbiologia alimentar. Regras gerais para análise microbiológica. Instituto Português de Qualidade, Lisboa.
- Norma Portuguesa NP-3005 (1985). Microbiologia alimentar. Preparação das diluições para análise microbiológica. Instituto Português de Qualidade, Lisboa.
- Ojeniyi, B., Wegener, H., Jensen, N. e Bisngaard, M., 1996. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiology investigations in seven Danish abattoirs. *J. Appl. Bacteriol.*, 80: 395-401.
- Pin, C., Fernando, G.G., Ordóñez, J.A. e Baranyi, J., 2001. Applying a generalized z-value concept to quantify and compare the effect of environmental factors on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 18: 539-545.
- Regulamento (CE) Nº 2073/2005 (2005) da Comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* L338, 26 p.
- Robinson, T., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J. e Mackey, B.M., 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiology*, 70: 163-173.
- Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., François, K., Devlieghere, F. e Debevere, J., 2004. Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiology*, 90: 219-236.
- Windhorst, H., 2003. Patterns of EU poultry meat production and trade. *World Poultry Magazine on Production, Processing & Marketing*, 9 (19): 12-15.

EFFECTS IN ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* AND *ENTEROCOCCUS* SPP. ISOLATED FROM BROILERS MEDICATED WITH AN ANTIBIOTIC ASSOCIATION CONTAINING FURAZOLIDONE

P. MARTINS DA COSTA^{1,3}, T. NUNES², P. VAZ-PIRES¹ e F. BERNARDO²

¹ICBAS - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto. Largo Prof. Abel Salazar, 2 4099-003 Porto; ²CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, Univ. Técnica de Lisboa. R. Prof. Cid dos Santos, Pólo Universitário da Ajuda, 1300-477 Lisboa; ³Bolseiro de Doutoramento da FCT (BD / 9968 / 2002) e-mail: pmcosta@icbas.up.pt

(Recepção: 8 de Setembro de 2006; Aprovado: 22 de Março de 2006)

ABSTRACT

Antimicrobial drugs play an important role in food animal production, but their widespread use may lead to illegal antimicrobial residues in meat and development and persistence of antibiotic resistances among bacteria. The aim of this study was to assess the biological consequences due to broiler administration, during ten days, via drinking water, of an antibiotic association containing chloramphenicol, neomycin and furazolidone. Faecal samples were weekly collected from two broiler groups (n=60) and 16 isolates of *Escherichia coli* and 16 of *Enterococcus* spp. were tested in each sample using the agar diffusion method. *E. coli* resistance rates to trimethoprim/sulfamethoxazole, streptomycin, kanamycin, chloramphenicol, nitrofurantoin and enrofloxacin were higher ($p < 0.0001$) in the medicated group and lower ($p < 0.0001$) to ampicillin and tetracycline compared with the control group. In contrast, only resistance to nitrofurantoin and ampicillin as increased among enterococci isolated from medicated group and only one isolated was resistant to chloramphenicol. The results illustrate the complex dynamics of resistance in enteric bacteria during the treatment, showing how difficult could be the construction of reliable *in vivo* models to predict the effects of selective pressure induced by antibiotics over commensal bacteria. Average daily gains and feed intakes were higher ($p < 0.0001$) for the medicated broilers; no differences were found in mortality rates.

Key words: antibiotic resistance, broiler, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, furazolidone

IMPACTO DA ADMINISTRAÇÃO DE UMA ASSOCIAÇÃO ANTIBIÓTICA CONTENDO FURAZOLIDONA NO NÍVEL DE ANTIBIORRESISTÊNCIAS EM *ESCHERICHIA COLI* E *ENTEROCOCCUS* SPP. EM FRANGOS

RESUMO

Os antimicrobianos têm actualmente um papel importante na produtividade das espécies pecuárias. No entanto, o seu uso indiscriminado pode originar resíduos ilegais nas carnes e a emergência de antibiorresistências. O objectivo deste estudo foi o de avaliar as consequências biológicas da administração a frangos, durante dez dias, através da água de bebida, de uma associação antibiótica contendo cloranfenicol, neomicina e furazolidona. Amostras de fezes foram colhidas semanalmente nos dois grupos de frangos (medicado e controlo) (n=60). A partir de cada amostra isolaram-se 16 *Escherichia coli* e 16 *Enterococcus* spp. para a determinação do perfil de antibiorresistência usando o método de difusão em ágar. Durante o ensaio registaram-se igualmente a evolução do peso corporal, o consumo alimentar e a mortalidade. As taxas de resistência em *E. coli* ao sulfametoxazol-trimetoprim, estreptomicina, canamicina, cloranfenicol, nitrofurantoína e enrofloxacina foram superiores ($p < 0,0001$) no grupo medicado e inferiores ($p < 0,0001$) relativamente à ampicilina e tetraciclina, comparando com as obtidas no grupo controlo. Pelo contrário, nos enterococos apenas a resistência à nitrofurantoína e ampicilina aumentou no grupo medicado e somente um isolado exibiu resistência ao cloranfenicol. Os resultados ilustram a complexidade da dinâmica das resistências nas bactérias entéricas durante o tratamento, demonstrando a extrema dificuldade na elaboração de modelos que, *in vivo*, possam ajudar a prever os efeitos da pressão selectiva exercida pelos antibióticos sobre as bactérias comensais. O ganho médio diário de peso corporal e a ingestão alimentar foram superiores ($p < 0,001$) nas aves medicadas, não se tendo encontrado diferenças nas taxas de mortalidade.

Palavras-chave: antibiorresistência, *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, frangos, furazolidona

INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos 40 anos, a evolução demográfica, o desenvolvimento tecnológico, a alteração dos hábitos alimentares e a globalização dos mercados causaram profundas alterações nos sistemas de produção animal e vegetal,

predominando actualmente o regime intensivo em sistema fechado (Smith, 1993; Schwarz *et al.*, 2001; Teuber, 2001). A avicultura é o ramo da pecuária que levou mais longe o conceito de intensificação e de produção em larga escala. Em 25 anos, o peso vivo de um frango aos 42 dias de idade aumentou em 1,375 kg. No mesmo período de tempo, o índice de conversão para aves com 2 kg de peso vivo diminuiu de 2,50 para 1,65 (JETACAR, 1999). A actual performance produtiva - decorrente da evolução genética, nutrição, prevenção sanitária e biológica, infra-estruturas, equipamentos pecuários e técnicas de manejo - depende da ausência de estados mórbidos para a sua expressão otimizada (Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001; Tollefson e Karp, 2004). No entanto, diversos factores intrínsecos opõem-se a esta necessidade: a intensificação produtiva e o consequente stresse fisiológico e a elevada concentração animal, facilitando o contágio e criando condições ecológicas muito favoráveis à emergência de determinados microrganismos. As falhas periódicas dos sistemas de biossegurança das explorações, dos alimentos compostos e dos pintos do dia completam um quadro de ameaças potenciais à saúde das aves, cuja contenção assenta no uso terapêutico e preventivo de antibióticos. Este último faz-se através da sua incorporação contínua no alimento, numa dosagem muito baixa, variável entre 2,5 e 50 mg/kg, e através da administração oral, durante um período de três a cinco dias, via água de bebida ou alimento composto, em dosagens sub-terapêuticas, nas fases mais críticas do ciclo produtivo: recepção de pintos do dia e mudança da dieta alimentar.

Nesta perspectiva, a ténue linha divisória entre a rendibilidade e o risco fica em grande parte dependente do uso sistemático de antibióticos, com a inevitável emergência de antibiorresistências as quais, por sua vez, determinam uma perda da sua eficiência (van den Bogaard *et al.*, 2002), influyendo negativamente nos índices produtivos e na saúde e bem-estar das aves (Schwarz *et al.*, 2001). Por outro lado, as antibiorresistências seleccionadas no domínio pecuário repercutem-se negativamente na saúde humana, pela emergência de bactérias zoonóticas multirresistentes (Teuber, 2001; Anderson *et al.*, 2003) e pela possibilidade dos determinantes genéticos de resistência seleccionados na flora comensal (*e.g. Escherichia coli* e *Enterococcus spp.*) se transferirem para organismos patogénicos humanos (Witte, 2000).

A tomada de consciência acerca das repercussões em medicina humana, decorrentes do uso de antibióticos em produção pecuária tem fundamentado, particularmente dentro da União Europeia, uma política de restrição e proibição

do uso em produção animal de um número crescente de antibióticos considerados importantes para a terapêutica humana (Anderson *et al.*, 2003). Esta política gera um aumento compensatório na utilização das moléculas disponíveis, criando maior pressão selectiva para a ocorrência de antibiorresistências, reduzindo por sua vez e proporcionalmente a respectiva eficácia, essencial à produtividade e competitividade deste sector (Tollefson e Karp, 2004). A quase estagnação a que se tem assistido nas últimas duas décadas no desenvolvimento e registo de novos antibióticos para uso pecuário representam um problema suplementar, criando sérias dificuldades no controlo da sanidade avícola (American Academy of Microbiology, 1999).

Em 2003, a crise dos nitrofuranos em Portugal emergiu da confluência desta necessidade da avicultura dispor de antimicrobianos com elevado nível de eficácia, com um conjunto de ameaças antigas: a falta de quadros técnicos nas integrações avícolas, as carências formativas e informativas da esmagadora maioria dos avicultores, a pressão competitiva a que estão sujeitas as fábricas de alimentos compostos para aves e a existência de um mercado paralelo de venda de medicamentos (Martins da Costa, 2002).

Os nitrofuranos são quimioterápicos sintéticos com um largo espectro antimicrobiano, que abrange a generalidade das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Inibem vários sistemas enzimáticos microbianos, embora o mecanismo básico de acção não esteja cabalmente esclarecido. A ocorrência de mutações que confirmam resistência são eventos raros e a resistência clínica aparece lentamente. As resistências cruzadas abrangem todas as substâncias do grupo, não se conhecendo no entanto resistências cruzadas para outros antibacterianos (Vaz da Silva, 2001). Considerando o seu potencial de genotoxicidade e de carcinogenicidade, está proibido o uso destes antimicrobianos em animais de produção na União Europeia desde Junho de 1995 para a furazolidona (Jornal Oficial, 1993), desde Janeiro de 1997 para a furaltadona, nitrofurantoína e nitrofurazona (Jornal Oficial, 1995) e desde Março de 2003 para o nifurzol (Jornal Oficial, 1999).

Para além dos perigos químicos associados ao uso de antibióticos, são essencialmente os perigos biológicos (*i.e.* antibiorresistências) a suscitarem actualmente as maiores preocupações (Teshager *et al.*, 2000; Cools *et al.*, 2001). Neste trabalho, pretende-se fazer a avaliação do potencial dos antimicrobianos para indução, ampliação e enriquecimento de antibiorresistências em bactérias entéricas, *E. coli* e *Enterococcus* spp., através de um estudo baseado na exposição de uma população avícola (n=30), durante uma fase do período de cria (25 aos

35 dias), a uma associação contendo diversos antimicrobianos. Atendendo a que não existe uma relação linear entre as quantidades administradas de um determinado antimicrobiano e o desenvolvimento de antibiorresistências a esse agente (JETACAR, 1999; Heuer *et al.*, 2002), este estudo focou sobretudo a avaliação da pressão selectiva exercida sobre fenótipos resistentes, procurando fenómenos de resistência cruzada e de co-selecção de genes de resistência. Foram também estudados os fenómenos de resistência múltipla.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Providenciou-se um espaço físico adequado ao alojamento de frangos durante o seu período de cria, compreendido entre os zero e os trinta e cinco dias de idade. Selecionou-se um local distanciado, pelo menos 200 metros, de outras estruturas pecuárias, e que não tivesse sido previamente ocupado por outras aves, ou qualquer outra espécie com interesse zootécnico. Esse espaço foi convenientemente dividido em dois compartimentos separados, posteriormente equipados de forma adequada à criação de frangos, nomeadamente no que respeita à alimentação, fornecimento de água, densidade vital, temperatura, renovação do ar, estado da cama e iluminação. A ambos os grupos foram fornecidos alimentos compostos comerciais para frangos.

Foi utilizado um produto comercial de utilização veterinária em aves ornamentais (Furanfenicol Vet[®]), com a seguinte composição por 100 g: 5 g de cloranfenicol, 1 g de sulfato de neomicina e 1 g de furazolidona.

Adquiriram-se a um produtor avícola português 60 pintos do dia da estirpe Cobb 500, que foram aleatoriamente divididos em dois grupos iguais: grupo teste (n=30), medicado com a associação antibiótica dos 25 aos 35 dias de idade, através da água de bebida (doseado a 3,2 g/l de água), e o grupo controlo (n=30), ao qual foi administrado bicarbonato de sódio na mesma concentração da mistura antibiótica.

Durante o período de cria, as aves em ensaio foram visitadas duas vezes por dia para se proceder aos registos essenciais e a fim de serem verificadas e asseguradas a alimentação e as condições ambientais adequadas ao seu desenvolvimento. Semanalmente efectuou-se a pesagem individual de todas as aves e registou-se a quantidade de alimento consumido. Concluído o estudo, as aves foram sacrificadas humanitariamente e eliminadas como subprodutos da categoria 1.

Colheita das amostras

No momento da recepção dos pintos do dia foi recolhido mecónio, através de zaragatoa cloacal, em 30 pintos retirados aleatoriamente. Com uma periodicidade semanal (dias 7, 14, 21, 28 e 35), recolheu-se em cada grupo, de uma forma aleatória em diversos pontos do parque, uma amostra composta de fezes. Após iniciado o tratamento com a mistura antibiótica, as amostras recolhidas nos grupos teste e controlo foram processadas separadamente. Todas as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica refrigerada e transportadas para o laboratório, sendo processadas nas dez horas subsequentes à sua colheita.

Processamento das amostras

Isolamento

Suspenderam-se 25 g de fezes de cada amostra em 225 ml de Água Peptonada Tamponada (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) (APT). Depois de homogeneizadas em Stomacher (Lab. Blender 80, Seward Medical, London, Reino Unido) semeou-se, por esgotamento em estria, 1 µl de cada suspensão em duas geloses: Kanamycin Aesculin Azide Agar Base (Oxoid) (KAA) e Tergitol BCIG Agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, França) (Tergitol), para o isolamento de enterococos e *E. coli*, respectivamente. Após incubação a 37 °C durante 24 h, todas as geloses de isolamento foram minuciosamente observadas à lupa (Nikon, Japão) com uma ampliação de vinte vezes, para avaliação sumária da diversidade morfológica e da viabilidade da selecção. Por cada amostra seleccionaram-se 16 isolados de *E. coli* e 16 de *Enterococcus* spp., presumivelmente identificados mediante a realização de provas bioquímicas (Cools *et al.*, 2001).

Teste de antibiorresistência

O fenótipo de antibiorresistência dos isolados foi determinado através da técnica de difusão em ágar de acordo com o protocolo do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2000) para testes de antibiorresistência em bactérias. Os critérios de interpretação foram igualmente aplicados segundo o protocolo do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2000, 2002) para testes de antibiorresistência em bactérias. A interpretação relativa à apramicina efectuou-se segundo as directrizes do fabricante (Elanco Lilly Farma, USA). Na selecção dos antimicrobianos a testar foram consideradas todas as classes clinicamente relevantes para a medicina humana e veterinária, bem como as semelhanças de actividade *in vitro* entre diversos antimicrobianos, adoptando-

se a lista proposta pelo *Office International des Epizooties* (2000) para programas de monitorização e vigilância: vancomicina (VAN, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), quinupristina-dalfopristina (Q/D, 15 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), cloranfenicol (CHL, 30 µg), gentamicina (GEN, 120 µg e 10 µg), rifampicina (RIF, 5 µg), tetraciclina (TET, 30 µg), nitrofurantoína (NIT, 300 µg), eritromicina (ERY, 30 µg), amoxicilina + ácido clavulâmico (AMC, 30 µg), cefalotina (CEF, 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT, 25 µg), estreptomicina (STR, 10 µg), apramicina (APR, 15 µg), canamicina (KAN, 20 µg) e enrofloxacina (ENR, 5 µg), com discos comerciais certificados (Oxoid). Foram usadas as estirpes de referência *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *E. coli* ATCC 25922 para o controlo da qualidade da técnica.

Todos os isolados foram conservados a -30 °C em tubos com glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 20 % em Água de Peptona (Oxoid).

Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando o *software* estatístico SPSS (Vers. 12), recorrendo ao teste do Qui-quadrado, ou ao teste Exacto de Fisher quando apropriado, sendo consideradas estatisticamente significativas as diferenças com valor de $p < 0,001$.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra os efeitos da mistura antibiótica na evolução do crescimento. A evolução do peso nos dois grupos foi praticamente coincidente até aos 21 dias de idade. Após dez dias de administração, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre os dois lotes de aves, registando o grupo medicado um peso 7,9 % superior ao do grupo controlo.

Aos 35 dias, a uniformidade (percentagem de elementos com um peso pertencente ao intervalo peso médio ± 10 %) registada no grupo medicado (82 %) foi superior à obtida no grupo controlo (75 %). Em ambos os grupos registaram-se 4 mortos, a que correspondeu uma taxa de mortalidade de 1,3 %. O consumo cumulativo de alimento composto foi de 3,186 kg para o grupo controlo e de 3,401 kg para o grupo medicado, a que corresponderam respectivamente índices de conversão alimentar de 1,665 e de 1,646.

No respeitante à evolução das antibiorresistências em *E. coli*, no grupo controlo o número de isolados resistentes foi oscilante para a enrofloxacina e

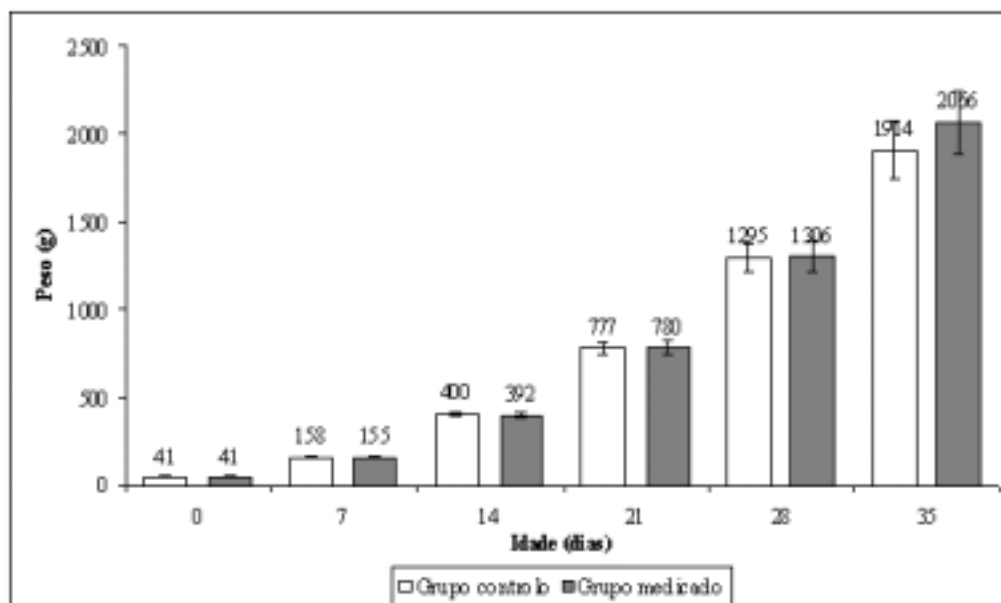


Figura 1 - Evolução semanal do peso médio dos lotes em estudo.

sulfametoxazol-trimetoprim, crescente para a ampicilina e manteve-se estável relativamente à tetraciclina e estreptomicina, não se registando qualquer isolado resistente aos restantes aminoglicósidos testados (Quadro I).

Quadro I - NÚMERO DE *E. coli* ANTIBIORRESISTENTES ISOLADAS POR AMOSTRA.

Idade (dias)	Grupo medicado						Grupo controlo					
	0	7	14	21	28	35	0	7	14	21	28	35
AMP	8	9	9	8	3	6	8	9	9	8	12	12
AMC	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
CEF	3	4	0	0	0	0	3	4	0	0	0	0
TET	12	13	13	12	6	6	12	13	13	12	13	13
SXT	4	7	4	7	13	12	4	7	4	7	5	2
STR	3	3	5	5	13	12	3	3	5	5	4	3
KAN	0	0	0	0	13	16	0	0	0	0	0	0
GEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
APR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHL	0	2	1	1	13	16	0	2	1	1	2	1
NIT	0	3	3	3	13	16	0	3	3	3	0	0
ENR	4	3	1	5	10	16	4	3	1	5	1	0

Quadro II - FENÓTIPOS DE ANTIBIORRESISTÊNCIA NAS ESTIRPES DE *E. coli* ISOLADAS NO GRUPO MEDICADO (N=96).

Perfis	Idade (dias)						total
	0	7	14	21	28	35	
Sensível a todos os antimicrobianos	3		2	2			7
ENR ^R				1			1
SXT ^R			1	1			2
SXT ^R CHL ^R NIT ^R ENR ^R					3		3
SXT ^R STR ^R KAN ^R CHL ^R NIT ^R ENR ^R					7	10	17
TET ^R	1	4		1			6
TET ^R ENR ^R	4						4
TET ^R SXT ^R			3				3
TET ^R STR ^R KAN ^R NIT ^R					3		3
TET ^R SXT ^R NIT ^R			1				1
TET ^R SXT ^R STR ^R NIT ^R ENR ^R		2		3			5
TET ^R SXT ^R STR ^R CHL ^R							0
TET ^R SXT ^R STR ^R CHL ^R NIT ^R ENR ^R		1					1
AMP ^R TET ^R	1	4	5	5			15
AMP ^R TET ^R NIT ^R			1				1
AMP ^R TET ^R KAN ^R CHL ^R NIT ^R ENR ^R						4	4
AMP ^R TET ^R STR ^R							0
AMP ^R TET ^R STR ^R NIT ^R			1				1
AMP ^R TET ^R SXT ^R	3		1				4
AMP ^R TET ^R SXT ^R NIT ^R		1					1
AMP ^R TET ^R SXT ^R CHL ^R NIT ^R				1			1
AMP ^R TET ^R SXT ^R STR ^R	1			2			3
AMP ^R TET ^R SXT ^R STR ^R CHL ^R ENR ^R			1				1
AMP ^R TET ^R SXT ^R STR ^R KAN ^R CHL ^R					3		3
AMP ^R TET ^R SXT ^R STR ^R KAN ^R CHL ^R						2	2
NIT ^R ENR ^R							2
AMP ^R CEF ^R SXT ^R		3					3
AMP ^R CEF ^R TET ^R		1					1

Durante o período de administração dos antimicrobianos, verificaram-se nos isolados de *E. coli* diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) nas resistências à ampicilina, tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprim, estreptomicina,

canamicina, cloranfenicol, nitrofurantoína e enrofloxacina, entre o grupo controlo e o medicado, registando-se neste último um decréscimo muito acentuado no número de resistências à ampicilina e à tetraciclina e um aumento igualmente expressivo nas resistências aos restantes antimicrobianos referidos.

Na fase que antecedeu a administração da associação antibiótica, AMP^R TET^R foi o fenótipo de resistência dominante quer em número de isolados (n=15), quer em número de amostras a partir das quais foi recuperado (n=4). Após o início do tratamento, não se obteve qualquer perfil igual aos anteriormente isolados, identificando-se 6 novos perfis: 2 tetraresistentes, 3 hexarresistentes e 1 octarresistente. O perfil SXT^R STR^R KAN^R CHL^R NIT^R ENR^R foi isolado 17 vezes no conjunto das amostras colhidas após o início do tratamento. Após 10 dias de administração, todos os isolados eram pelo menos hexarresistentes e tinham resistências simultâneas à nitrofurantoína, cloranfenicol, canamicina e enrofloxacina (Quadro II).

A resposta à pressão selectiva exercida pelos antimicrobianos foi diferente relativamente aos enterococos: após a administração dos antimicrobianos verificou-se um decréscimo muito ligeiro no número de resistências à eritromicina, tendo desaparecido por completo as resistências à rifampicina e ciprofloxacina. Pelo contrário, aumentou o número de isolados resistentes à ampicilina,

Quadro III - NÚMERO DE *Enterococcus* spp. ANTIBIORRESISTENTES ISOLADOS POR AMOSTRA.

Idade (dias)	Grupo medicado						Grupo controlo					
	0	7	14	21	28	35	0	7	14	21	28	35
AMP	0	0	1	2	6	7	0	0	1	2	2	1
VAN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Q/D	1	0	1	3	0	0	1	0	1	3	2	1
TET	11	14	13	14	16	16	11	14	13	14	16	16
RIF	1	3	7	6	4	0	1	3	7	6	1	0
ERY	3	11	12	10	7	9	3	11	12	10	11	8
GEN	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
CHL	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
NIT	1	7	7	7	10	15	1	7	7	7	9	13
CIP	0	0	1	2	0	0	0	0	1	2	1	1

nitrofurantoína e tetraciclina. Apenas um dos trinta e dois isolados, obtidos durante o período de administração dos antimicrobianos, evidenciou resistência ao cloranfenicol. Nenhum isolado demonstrou resistência à gentamicina (Quadro III). No grupo controlo, o número de isolados resistentes foi oscilante para a rifampicina e crescente para a tetraciclina, eritromicina e nitrofurantoína. Isolaram-se 6 enterococos resistentes à ampicilina, 5 resistentes à ciprofloxacina e 1 com elevado nível de resistência à gentamicina (Quadro III).

DISCUSSÃO

O *Office International des Epizooties* (2000) considera *E. coli* e *Enterococcus* spp. como microrganismos essenciais ao estudo das antibiorresistências, devido à sua abundância no biótipo intestinal e à grande capacidade em adquirirem genes de resistência.

A utilização de antibióticos em avicultura, com fins metafilácticos e terapêuticos, tem como alvo principal a bactéria *E. coli*, responsável por um conjunto muito diversificado de síndromes quer na qualidade de agente primário, quer como invasor oportunista secundário à infecção por micoplasmas (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*), vírus (Paramixovírus, Picornavírus, Calicivírus, Birnavírus) e protozoários (*Eimeria* spp.) (Gross, 1991). Os *Enterococcus* spp. são bactérias comensais com grande ecorresistência, comprovada na capacidade de sobreviver longos períodos fora do hospedeiro animal, alargando assim o risco de transferência biológica ao homem através de fontes ambientais, como são a água e os vegetais cultivados em solos fertilizados com estrumes ou regados com águas contaminadas com efluentes provenientes de explorações animais (Kühn *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2003).

O estudo da evolução dos níveis de antibiorresistência baseia-se no princípio segundo o qual qualquer antibiótico administrado exercerá uma pressão selectiva nas bactérias expostas, estimulando a emergência de antibiorresistências (Acar e Röstel, 2001; Sáenz *et al.*, 2001). Neste sentido, estudos realizados em condições de campo permitem quantificar estes efeitos e contribuem para o esclarecimento das complexas interacções bióticas que se estabelecem na presença de antibióticos (Teshager *et al.*, 2000; FAAIR, 2002; Anderson *et al.*, 2003).

Na análise comparativa dos resultados relativos às duas espécies microbianas estudadas, verifica-se que a pressão selectiva exercida pelos

antimicrobianos expressa-se com maior intensidade e nitidez em *E. coli*. O facto dos enterococos possuírem maior número de resistências intrínsecas aos antibióticos (Herrero *et al.*, 2000; van den Bogaard *et al.*, 2002; Mutnick *et al.*, 2003) e uma maior capacidade de adaptação e sobrevivência em situações de stresse ambiental (Kühn *et al.*, 2000; Manero *et al.*, 2002; Hayes *et al.*, 2003), possibilitando a sua circulação massiva entre diversos nichos ecológicos, contribuem decisivamente para uma expressão menos clara da pressão selectiva imediata.

No grupo controlo, a evolução das antibiorresistências nos enterococos, ao contrário do verificado em *E. coli*, demonstrou uma dinâmica própria com grandes oscilações no número de resistências à nitrofurantoína, tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol. A verificação, em trabalhos preliminares (Martins da Costa, 2002) da existência de elevados níveis de antibiorresistência a estes antimicrobianos nos enterococos isolados em alimentos compostos para aves, pode explicar as referidas flutuações, dado ser possível a existência de um fluxo cumulativo de enterococos cujo perfil de resistência foi condicionado a montante, quer pelos fenótipos pré-existentes nas matérias-primas, quer pela pressão selectiva ou co-selectiva exercida pelos antimicrobianos incorporados nos alimentos. A análise da evolução das antibiorresistências em enterococos permite não só confirmar a existência deste fluxo, como também inferir a sua enorme relevância qualitativa e quantitativa, ao ponto de “diluir” os efeitos selectivos exercidos pelos antimicrobianos administrados durante a cria sobre os enterococos “indígenas”. Seria contudo interessante verificar se a administração de uma dosagem mais elevada poderia suprimir este efeito; no trabalho presente utilizou-se uma dose de furazolidona equivalente a metade da dose recomendada por Snoeyenbos e Williams (1991) para o tratamento de salmonelose, dada a associação com outros antimicrobianos. A inoculação das aves com *E. coli* veiculadas através dos alimentos compostos é previsivelmente menos importante para esta espécie, devido à sua menor ecorresistência (Cools *et al.*, 2001), sendo mais provável a sua inibição pela elevada temperatura associada ao processo de granulação (80 °C durante 10 minutos), e pela adição de ácidos orgânicos, numa concentração de 0,5 %, antes do referido tratamento térmico, conforme prática habitual no fabrico destes alimentos.

A evolução das resistências em *E. coli* no grupo medicado ilustra o elevado potencial destes antimicrobianos para a selecção e ampliação de antibiorresistências, contrariando radicalmente, pelo menos ao nível da flora

entérica, a máxima clínica segundo a qual a administração prolongada e a associação de antibióticos contrariam a emergência de antibiorresistências.

No caso de *E. coli* verificou-se uma selecção directa pelo cloranfenicol, selecção indirecta (resistências cruzadas) relativamente à nitrofurantoína, canamicina e estreptomicina, e selecção accidental (*i.e.* na ausência de uma pressão selectiva específica) relativamente à enrofloxacina e ao sulfametoxazol-trimetoprim. Este enriquecimento populacional de bactérias antibiorresistentes explica-se, quer por um mecanismo simples de sobrevivência diferencial dos clones previamente resistentes, quer por mecanismos mais complexos baseados na aquisição de genes que codifiquem mecanismos de antibiorresistência aos antimicrobianos administrados (Acar e Röstel, 2001; Anderson *et al.*, 2003). Este último processo tem uma maior relevância epidemiológica devido ao seu carácter interespecífico, massivo, por ser horizontal, e simultaneamente imprevisível, pois mediante associações genéticas muito diversas, a presença de um antibiótico pode estimular a transferência accidental de genes que codifiquem mecanismos de antibiorresistência a antibióticos pertencentes a famílias químicas diferentes (Teuber, 2001; Heuer *et al.*, 2002).

A selecção accidental de resistências à enrofloxacina e ao sulfametoxazol-trimetoprim na *E. coli* e o comportamento divergente das antibiorresistências na *E. coli* e nos enterococos relativamente à ampicilina e enrofloxacina/ciprofloxacina ilustram a extrema complexidade e a diversidade das interacções bióticas e genéticas que se estabelecem na presença de antimicrobianos, inviabilizando a existência de uma relação linear entre a administração de um determinado antimicrobiano e a emergência de antibiorresistências. A evolução das antibiorresistências é fortemente condicionada, quer pela flora microbiana pré-existente no animal (Schwarz *et al.*, 2001), quer por aquela que se vai sucessivamente adicionando a partir do microbismo da exploração ou através dos alimentos compostos e da água de bebida (Witte, 2000; Teuber, 2001; van den Bogaard e Stobberingh, 2002). O facto de após iniciada a administração dos antimicrobianos se ter identificado apenas um enterococo (3,1 %) resistente ao cloranfenicol em 32 isolados, por oposição a 29 *E. coli* (90,6 %) resistentes, ilustra a importância da existência de competências prévias nestes microrganismos. Nesta óptica, a qualidade tem maior importância do que a quantidade da antibiorresistência. Esta observação confirma a perspectiva segundo a qual as bactérias multirresistentes são selectivamente favorecidas em virtude de poderem sobreviver à exposição de diversos antibióticos, sendo portanto mais propensas à aquisição de novas resistências (JETACAR, 1999).

No seu conjunto, estas observações têm grande relevância epidemiológica dado confirmarem a tendência para a aceleração exponencial das antibiorresistências em função do uso dos antimicrobianos e reforçam a extrema importância de um uso muito prudente e diferenciado dos antibióticos nos domínios humano e animal.

Os parâmetros relativos ao crescimento dos frangos e à conversão alimentar ilustram os efeitos muito positivos da associação antibiótica administrada sobre os indicadores de produtividade. A tradução económica destes resultados, aplicando os valores de um contrato padrão, fixa em 0,057 € o ganho suplementar por ave criada. A extrapolação teórica destes valores para as 242 992 toneladas produzidas em Portugal (GPPAA, 2002) significaria um aumento de 9 893 246 € no rendimento líquido dos avicultores nacionais no ano 2001.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, pela disponibilização do Laboratório de Inspeção Sanitária e à Avicasal – Sociedade Avícola S.A., pelo apoio logístico.

BIBLIOGRAFIA

- Acar, J. e Röstel, B., 2001. Antimicrobial resistance: an overview. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 20(3): 797-810.
- American Academy of Microbiology, 1999. Antimicrobial Resistance. An Ecological Perspective. Washington: American Society for Microbiology. (<http://www.asmsa.org/acasrc/aca1.htm>).
- Anderson, A.D., Nelson, J.M., Rossiter, S. e Angulo, F.J., 2003. Public Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Food Animals in the United States. *Microb. Drug Resist.*, 9(4): 373-379.
- Choi, S., Chu, W., Brown, J., Becker, S.J., Harwood, V.J. e Jiang, S.C., 2003. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. *Mar. Pollut. Bull.*, 46: 748-755.
- Cools, D., Merckx, R., Vlassak, K. e Verhaegen, J., 2001. Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Appl. Soil Ecol.*, 17: 53-62.
- Facts about Antimicrobials in Animals and the Impact on Resistance (FAAIR) Scientific Advisory Panel, 2002. Policy Recommendations. *Clin. Infect. Dis.*: 34 (Supl 3), S76-77.
- Gabinete de Planeamento e Política Agro-Alimentar (GPPAA), 2002. Anuário Pecuário. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Lisboa.
- Gross, W.B., 1991. Colibacillosis. In: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid and H.W. Yoder, Jr. (eds.), *Diseases of Poultry*, 9 ed., Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 780-797.

- Hayes, J.R., English, L.L., Carter, P.J., Proescholdt, T., Lee, K.Y., Wagner, D.D. e White, D.G., 2003. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12): 7153-7160.
- Herrero, I.A., Teshager, T., Garde, J., Moreno, M.A. e Domínguez, L., 2000. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREF) in pig faeces from slaughterhouses in Spain. *Prev. Vet. Med.*, 47: 255-262.
- Heuer, O.E., Pedersen, K., Andersen, J.S. e Madsen, M., 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) in Broiler Flocks 5 Years after the Avoparcin Ban. *Microb. Drug Resist.*, 8(2): 133-138.
- Joint Expert Advisory Committee on Antibiotic Resistance (JETACAR), 1999. The use of antibiotics in food-producing animals: antibiotic-resistant bacteria in animals and humans. Commonwealth Department of Health and Aged Care and Commonwealth Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, Australia.
- Jornal Oficial nº L 264 de 23/10/1993 p. 0001 – 0004, Regulamento da Comissão nº 2901/93.
- Jornal Oficial nº L 143 de 27/06/1995 p. 0026 – 0030, Regulamento da Comissão nº 1442/95.
- Jornal Oficial nº L 060 de 09/03/1999 p. 0016 – 0052, Regulamento da Comissão nº 508/99.
- Kühn, I., Iversen, A., Burman, L.G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F., Seyfarth, A.M., Blanch, A.R., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M.A., Dominguez, L. e Möllby, R., 2000. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. Example of an ongoing project within the European research programme. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14: 337-342.
- Manero, A., Vilanova, X., Cerdà-Cuéllar, M. e Blanch, A.R., 2002. Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of *Enterococci*. *Water Res.*, 36: 2831-2835.
- Martins da Costa, P., 2002. Resistências Antimicrobianas em Avicultura. Proc. Congresso de Ciências Veterinárias comemorativo dos 100 anos da Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias. TagusPark de Oeiras, pp. 251-259.
- Mutnick, A.H., Biedenbach, D.J. e Jones, R.N., 2003. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn. Microbiol. Infect Dis.*, 46: 63-68.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard M2-A7, Wayne, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved standard M31-A2, Wayne, Pa.
- Office International des Epizooties (OIE), 2000. Methodologies for the evaluation and containment of antimicrobial resistance in bacterial of animal origin. Guideline nº 2: Prudent and Responsible Use of Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine, pp. 2-16.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F. e Torres, C., 2001. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 18: 353-358.

- Schwarz, S. e Chaslus-Dancla, E., 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet. Res.*, 32: 201-225.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C. e Walsh, T.R., 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17: 431-437.
- Smith, W.J., 1993. Antibiotics in feed, with special reference to pigs: a veterinary viewpoint. *Animal Feed Sci. and Technol.*, 45: 57-64.
- Snoeyenbos, G.H. e Williams, J.E., 1991. Salmonellosis. In: B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid and H.W. Yoder, Jr. (eds.), *Diseases of Poultry*, 9 ed., Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 780-797.
- Tauxe, R.V., Cavanagh, T.R. e Cohen, M.L., 1989. Interspecies gene transfer in vivo producing an outbreak of multiply resistant Shigellosis. *J. Infect. Dis.*, 160: 1067-1070.
- Teshager, T., Herrero, I.A., Porrero, M.C., Garde, J., Moreno, M.A. e Domínguez, L., 2000. Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 15: 137-142.
- Teuber, M., 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4: 493-499.
- Tollefson, L. e Karp, B.E., 2004. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Conséquences sur la santé humaine de l'utilisation d'antibiotiques dans l'alimentation animale. Méd. Mal. Infect.*, 34: 514-521.
- Witte, W., 2000. Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 14: 321-325.
- van den Bogaard, A.E. e Stobberingh, E.E., 2002. Contamination of animal feed by multiresistant enterococci. *Lancet*, 354: 163-164.
- van den Bogaard, A.E., Willems, R., London, N., Top, J. e Stobberingh, E.E., 2002. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.*, 49: 497-505.
- Vaz da Silva, M., 2001. Outros quimioterápicos antibacterianos. In: W. Osswald e S. Guimarães (Coordenação), *Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas*, 4ª ed., Porto Editora, pp. 900-947.