

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

MARIA VICTORIA PEREIRA DE SOUZA

EFEITO DO CLORO NA ETAPA PRÉ-INSENSIBILIZAÇÃO SOBRE A
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CARÇAÇAS DE RÃ-TOURO
(*LITHOBATES CATESBEIANUS*)

UBERLÂNDIA

2023

MARIA VICTORIA PEREIRA DE SOUZA

EFEITO DO CLORO NA ETAPA PRÉ-INSENSIBILIZAÇÃO SOBRE A
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CARÇAÇAS DE RÃ-TOURO
(*LITHOBATES CATESBEIANUS*)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina
Veterinária – FAMEV da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito
parcial à obtenção do grau de Médica
Veterinária.

Orientador: Marcus Vinicius Coutinho
Cossi

UBERLÂNDIA

2023

MARIA VICTORIA PEREIRA DE SOUZA

EFEITO DO CLORO NA ETAPA PRÉ-INSENSIBILIZAÇÃO SOBRE A
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CARÇAÇAS DE RÃ-TOURO
(*LITHOBATES CATESBEIANUS*)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Medicina
Veterinária – FAMEV da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito
parcial à obtenção do grau de Médica
Veterinária.

Uberlândia, 06 de fevereiro de 2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcus Vinicius Coutinho Cossi
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Kênia de Fátima Carrijo
Universidade Federal de Uberlândia

M.V. Doutoranda Letícia Roberta Martins Costa
Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

À priori, agradeço a Deus pelo dom da racionalidade, o qual me trouxe até aqui. Essa força poderosa intangível, cuja fonte é desconhecida, me motivou várias vezes durante a confecção desta tese.

Agradeço também à minha família, sobretudo minha mãe, Jucelia; meus tios, Neia e Wellington e meus avós, Maria e João. Sem o apoio e a perseverança deles eu não estaria concluindo minha formação em uma Universidade Federal.

Ao meu orientador, Marcus Vinicius Cossi, pelo voto de confiança e pela exímia orientação desde o começo do projeto, durante o qual sempre esteve presente ativamente trazendo conhecimento, conselhos de grande valia e muito carisma. Seu trabalho dedicado como professor e orientador me fizeram almejar a carreira acadêmica.

Agradeço aos colegas da 84ª turma de Medicina Veterinária pelos aprendizados e momentos de lazer desprendidos ao longo da nossa graduação. Aos amigos mais íntimos agradeço, especialmente, pelas palavras motivadoras nos momentos difíceis.

À equipe do setor de Ranicultura da Fazenda Glória – UFU, sempre tão prestativos e atentos durante as atividades de coleta.

Agradeço também ao técnico do Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal, Alexandre, pelo tempo extra dedicado a me ajudar com as amostras.

Agradeço aos estudantes egressos Wesley Domenicci, Letícia Costa, Isabela Freire e Sthéfany Dias, pelos momentos de vivência no laboratório, por toda ajuda e colaboração, que foram cruciais para a construção do meu interesse pela área de microbiologia. Ao meu namorado Davi, por todo amor e compreensão desprendidos durante a confecção deste projeto. Sua atenciosidade e paciência em lidar comigo me cativam todos os dias.

Agradeço também ao grupo PET Medicina Veterinária por ter me proporcionado grande crescimento acadêmico e pessoal, em especial ao tutor Robson Carlos Antunes, o qual sempre me apoiou dentro e fora da Universidade. Não poderia deixar de agradecer à Professora Kênia Carrijo e à doutoranda Letícia por aceitarem fazer parte da minha banca e participarem comigo deste momento tão importante.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação humana e profissional, eu deixo aqui registrada a minha gratidão.

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância”*

John F. Kennedy

RESUMO

No Brasil, a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é classificada como pescado pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, devendo ser abatida e processada sob regime de inspeção oficial, e seguindo os preceitos de abate humanitário e controle higiênico-sanitário. Sabe-se que as rãs são possíveis reservatórios de patógenos de origem alimentar, como a *Salmonella* spp., sendo fundamental compreender como ocorre a contaminação da carne e padronizar as etapas de abate e processamento por meio de legislações, ainda inexistentes no país. Isto posto, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de diferentes concentrações de cloro sob a contaminação microbiológica de carcaças de rã-touro na etapa pré-abate. Tal avaliação foi feita contando-se os microrganismos indicadores de higiene, nomeadamente, bactérias aeróbias mesófilas (AM), coliformes a 35°C (C35) e *E. coli*, bem como a ocorrência de *Salmonella* spp. Para tanto, foram coletadas 142 amostras de carcaças de rãs-touro em dois pontos do abate, pós-sangria (A) e pós-toalete (B). As rãs passaram por tratamento prévio imergidas 10 minutos em baldes contendo água (grupo controle) e diferentes concentrações de cloro (5, 65 e 125 ppm). O método de coleta dessas amostras foi o de enxágue superficial de carcaça com solução salina, e as técnicas utilizadas nas contagens dos microrganismos indicadores de higiene foram, o *pour plate* com ágar Plate Count Agar (PCA) para AM, Petrifilm™ EC para *E. coli* e C35; e os padrões internacionais de identificação, ISO 6579, para *Salmonella* spp., como posterior confirmação pela técnica de PCR (genes *invA* e *ompC*). Mediante as análises, as concentrações de 65 e 125 ppm de cloro foram capazes de reduzir a contagem de AM na etapa B, quando comparadas ao grupo controle, sendo estas estatisticamente equivalentes à 5 ppm. Para C35 não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos, bem como entre as etapas do abate. Houve baixa ocorrência de *E. coli* e *Salmonella* spp. nas amostras. Por fim, indica-se o uso de 5 ppm de cloro na etapa de pré-insensibilização em vista da sua eficácia e custo-benefício em relação as concentrações maiores.

Palavras-chave: abate de rãs; qualidade microbiológica; salmonelose; cloro.

ABSTRACT

In Brazil, the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) is classified as fish by the Regulation of Industrial and Sanitary Inspection of Products of Animal Origin – RIISPOA, and must be slaughtered and processed under official inspection regime, and following the precepts of humane slaughter and control hygienic-sanitary. It is known that frogs are possible reservoirs of food-borne pathogens, such as *Salmonella* spp., and it is essential to understand how meat is contaminated and to standardize the slaughter and processing stages through legislation, which still does not exist in the country. That said, the present work aimed to evaluate the effect of different chlorine concentrations on the microbiological contamination of bullfrog carcasses in the pre-slaughter stage. This evaluation was carried out by counting the hygiene indicator microorganisms, namely mesophilic aerobic bacteria (AM), coliforms at 35°C (C35) and *E. coli*, as well as the occurrence of *Salmonella* spp. For this purpose, 142 samples of bullfrog carcasses were collected at two slaughter points, post-bleeding (A) and post-cleaning (B). The frogs underwent a previous treatment immersed for 10 minutes in buckets containing water (control group) and different concentrations of chlorine (5, 65 and 125 ppm). The method of collecting these samples was superficial rinsing of the carcass with saline solution, and the techniques used in the counts of hygiene indicator microorganisms were, the pour plate with agar Plate Count Agar (PCA) for AM, Petrifilm TM EC for *E. coli* and C35; and the international identification standards, ISO 6579, for *Salmonella* spp, with subsequent confirmation by the PCR technique (*invA* and *ompC* genes). Through the analyses, the concentrations of 65 and 125 ppm of chlorine were able to reduce the AM count in step B, when compared to the control group, which are statistically equivalent to 5 ppm. For C35, there was no statistical difference between any of the groups, as well as between the slaughter stages. There was low occurrence of *E. coli* and *Salmonella* spp in the samples. Finally, the use of 5 ppm of chlorine in the pre-stunning stage is indicated in view of its effectiveness and cost-effectiveness in relation to higher concentrations.

Keywords: frog slaughter; microbiological quality; salmonellosis; chlorine.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Aspectos históricos da produção de rã-touro no Brasil	11
2.2 Sistemas de criação e aspectos econômicos da produção de rã-touro	12
2.3 Aspectos nutricionais da carne de rã.....	13
2.4 Aspectos microbiológicos da carne de rã	14
2.5 Investigação de microrganismos indicadores de higiene e <i>Salmonella</i> spp. ...	15
2.6 Aspectos legais do abate e processamento de rã.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Local de coleta	18
3.2 Caracterização dos grupos	19
3.3 Análises Microbiológicas	20
3.3.1 Contagem de microrganismos indicadores de higiene.....	20
3.3.2 Identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	21
3.4 Análises Estatísticas.....	22
4. RESULTADOS.....	22
5. DISCUSSÃO.....	25
6. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a rã é classificada como pescado pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, devendo ser abatida e processada sob regime de inspeção oficial, e seguindo os preceitos de abate humanitário e controle higiênico-sanitário (AFONSO, 2016; BRASIL, 2017; BRASIL, 2021).

Estudos já identificaram os anfíbios como possível fonte de doença para humanos, seja na condição de animais de estimação ou como fonte proteica na alimentação humana (SHARMA; KAURA; SINGH, 1974; NICKELSON et al., 1975; TRUST; BARTLETT, 1979; MELLO et al., 2006; AYRES et al., 2015). Considerando que as rãs são um possível reservatório de patógenos de origem alimentar é fundamental compreender como os microrganismos conseguem contaminar a carne que será comercializada e padronizar todas as etapas de abate e processamento por meio de legislações (COSTA et al., 2021; CDC 2020; GRAY et al. 2007). Entretanto, ainda não há detalhes na legislação que discorra sobre as especificações das etapas de pré-abate e abate de anfíbios, consideradas como elos passíveis de contaminação microbiológica da carne (BRASIL, 2017; BRASIL, 2021).

Assim sendo, em virtude da ausência de uma padronização de parâmetros para essa espécie, são utilizadas extrapolações do que é feito com outros animais, o que gera lacunas no conhecimento e coloca em risco a segurança do alimento produzido. No que diz respeito ao uso de cloro na lavagem dos animais antes do abate, há na legislação diferentes valores para bovinos, aves e suínos. No entanto, para os anfíbios não há um valor definido em legislação e, portanto, considerando a recomendação dada pela Portaria nº 365 de 2021 (BRASIL, 2021), publicações científicas são utilizadas como base, nas quais encontra-se valores que variam de 5 a 200 ppm de cloro (NICKELSON et al., 1975; LOAIZA, 1996; MELLO, 2009; AFONSO et al., 2016; SEIXAS-FILHO et al., 2017; CRIBB et al., 2018).

Analisando-se os benefícios do consumo da carne de rã e seus derivados, tanto para saúde quanto para economia nacional, é inegável a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que abordem as etapas da cadeia produtiva referente à ranicultura. Nesse contexto, objetiva-se com o presente trabalho avaliar a influência de diferentes concentrações de cloro na água de lavagem das rãs nos procedimentos pré-abate sobre a contagem de microrganismos indicadores de higiene e ocorrência de *Salmonella* spp., a fim de contribuir para a construção ativa de conhecimento científico de qualidade e aplicável na área da ranicultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos da produção de rã-touro no Brasil

A ranicultura é uma atividade em expansão no território brasileiro e se caracteriza como o ramo da aquicultura responsável pela criação de rãs para fins comerciais (CRIBB et al., 2013). Embora existam relatos de que os índios já consumiam carne de rã, a criação em cativeiro iniciou-se somente em 1935, com a introdução da rã-touro gigante (*Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802) (Figura 1) no Rio de Janeiro (LIMA; AGOSTINHO, 1992). A espécie é originária da América do Norte, sua distribuição geográfica natural se estende do norte do Canadá até o leste dos Estados Unidos. A espécie foi introduzida em várias outras regiões, incluindo a América Central e do Sul, as ilhas do Caribe e sudeste da Ásia (FAO, 2020). A rã-touro recebe esse nome em virtude do som potente, o coaxar, que o macho profere na fase reprodutiva. Seu destaque em relação às espécies nativas do Brasil, como a rã-manteiga (*Leptodactylus latrans*, Linnaeus 1758) e a rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*, Spix 1824), se dá por sua precocidade de crescimento, rusticidade e alta fecundidade, características que a estabeleceram como a principal espécie criada nos ranários comerciais do país (CRIBB et al., 2013; PAHOR-FILHO et al., 2019).

Figura 1 – Rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*)



Fonte: Arquivo pessoal (2022)

2.2 Sistemas de criação e aspectos econômicos da produção de rã-touro

Existem três tipos de sistemas de produção: extensivo, semi-intensivo e intensivo. O sistema extensivo não é considerado pelos especialistas como um verdadeiro sistema de produção, pois não há controle sobre as taxas de mortalidade, alimentação, predadores, e os animais são frequentemente capturados para caça. Já o sistema semi-intensivo permite um controle parcial da produção e é amplamente utilizado em países como China e Taiwan. Por fim, o sistema intensivo é recomendado para se obter sucesso na criação, pois permite o controle de vários parâmetros durante as fases do ciclo de vida dos animais, resultando em maior rentabilidade (VIEIRA, 1985).

Os sistemas de criação de rãs sofreram várias transformações com o passar do tempo, sobretudo na região Sudeste do Brasil, que representou 69% da produção nacional em 2004 (OSTRENSKY et al., 2008). Ribeiro e Toledo (2022) realizaram um levantamento sobre a ranicultura brasileira e observaram que, dentre os 151 ranários distribuídos no país, 60,9% estão ativos, 13,2% estão inativos e 25,8% não possuem informação sobre as operações. Atualmente, pode-se dizer que não há um sistema padrão de instalações utilizado pelos ranicultores do país, de tal modo que cada um se adequa às suas condições locais. No entanto, três sistemas se destacam: a *Anfigranja* (LIMA; AGOSTINHO, 1992), as baias inundadas, utilizada apenas na fase de crescimento das rãs (MAZZONI et al., 1995); e a criação em gaiolas (SOUSA et al., 2010).

A *Anfigranja*, desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa, apresenta várias vantagens, como alta taxa de sobrevivência, melhor aproveitamento da ração, ganho de peso e conversão alimentar e, conseqüentemente, maior produtividade. Essas vantagens a consolidaram como o método mais popular entre os criadores brasileiros (PAHOR-FILHO et al., 2019; SOUSA, MALTAROLO, 2019). Já o sistema em gaiolas, proposto por Sousa e colaboradores (2010), apresenta como benefícios a padronização de lotes, boa adaptação ao ambiente de criação, baixa probabilidade de doenças infecciosas, fácil manejo, menor oscilação térmica e alta produtividade. Há ainda aqueles que preferam adotar o sistema de baias inundadas, que possibilita maior densidade animal e facilidade de manejo. Porém, do ponto de vista microbiológico, a água em constante contato com os animais, somada ao excesso de matéria orgânica, favorece a proliferação de microrganismos. Como consequência, observa-se aumento de lesões cutâneas, estresse e doenças no criatório (MAZZONI et al., 1995).

Atualmente, a aquicultura é o setor que mais cresce no mundo, com um aumento de cinco vezes na sua produção global de 1990 a 2015 (OTTINGER et al., 2018). Segundo especialistas, a consolidação da ricultura encontra-se em harmonia com a de outras cadeias aquícolas no Brasil. Nesse contexto, a demanda por produtos de alta qualidade nutricional, cuja produção se baseia nos princípios de viabilidade técnico-econômica e socioambiental, pode ser perfeitamente atendida pela carne de rã e pelos seus derivados (AFONSO; CRIBB, 2016). Entre 2010 e 2018 a produção mundial foi de aproximadamente 3.200 toneladas por ano, sendo Taiwan o líder de produtividade, mas com grande contribuição da Malásia, Singapura, Brasil, Equador e México, enquanto a Europa e os EUA representam os maiores importadores e consumidores (ALTHERR et al., 2011; FAO, 2020).

De acordo com os dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO, até 2012 o Brasil foi o segundo maior produtor de rãs-touro do mundo, produzindo 670 toneladas brutas e arrecadando cerca de 3,3 milhões de USD em 2000 (FAO, 2020; OSTRENSKY et al., 2008). Porém, os dados registrados pela FAO nos últimos anos são estimativas, já que o Brasil não reporta dados oficiais de produção desde 2014 (FAO, 2020). Em 2017, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) registrou a venda de 129,3 toneladas líquidas de carne de rã, representando 1,3 milhões de dólares (IBGE, 2021). Ao passo que, em 2019, foi registrada uma produção anual de 390,6 toneladas brutas de carne de rã-touro, o que reforça a importância econômica dessa atividade (RIBEIRO; TOLEDO, 2022).

Pahor-Filho et al. (2019), em consonância com Afonso e Cribb (2016), ressaltaram o grande potencial que o Brasil possui para aumentar significativamente a produção e o consumo de carne de rã, em especial pela abundância de água doce e pelo clima favorável aos anfíbios. Todavia, para atingir esse objetivo, ainda é preciso investigar alguns fatores que interferem na cadeia de produção.

2.3 Aspectos nutricionais da carne de rã

Uma pesquisa conduzida por Salviano et al. (2007) a respeito do consumo de carne de rã demonstrou que mais da metade dos entrevistados já a haviam consumido (57%) e que 12% nunca haviam consumido, porém pretendiam fazê-lo. Dentre as causas para o não consumo da carne de rã e seus derivados estão: aparência e estética dos produtos (WEICHERT et al., 2007), questões culturais, sabor do produto, marketing e

acessibilidade no mercado (OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, os altos preços encontrados nos varejos também limitam a comercialização, reduzindo seu consumo (WEICHERT et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2017). O rendimento da carcaça de rã tem uma média de 49% nos principais sistemas de produção do Brasil (AYRES et al., 2015). De acordo com Moura (2003), o mercado absorveria produtos industrializados à base de carne de rã, como linguiças, farinhas e patês, porém esse segmento somente se tornará viável se houver uma produção animal constante e de qualidade padronizada.

Em termos nutricionais, a carne de rã possui baixo teor lipídico (0,3%) e alto percentual proteico (16,52%) quando comparada a outras carnes, como a bovina, a suína e a avícola, sendo indicada como uma opção de alimento saudável (NOLL; LINDAU, 1987; MELLO et al., 2006; NÓBREGA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2017). Ademais, é a única carne produzida em cativeiro detentora de todos os aminoácidos essenciais ao ser humano (NOLL; LINDAU, 1987; PAIXÃO; BRESSAN, 2009). Além de ser considerada saborosa (OLIVEIRA et al., 2017), possui alta digestibilidade e seu uso é prescrito para crianças com intolerância às proteínas de origem animal, pacientes obesos, hipertensos e com hipertrigliciridemia (NÓBREGA et al., 2007; PAIXÃO; BRESSAN, 2009).

2.4 Aspectos microbiológicos da carne de rã

Tendo em vista a alta qualidade nutritiva da carne de rã, é preciso abordar também os aspectos inerentes à sua qualidade microbiológica, com a finalidade de garantir um produto seguro para os consumidores. A obtenção da carne de rã, bem como a de outras carnes, é passível de contaminação e merece minuciosa atenção nas etapas que integram o processo.

No que diz respeito às etapas com maiores riscos de contaminação, inicialmente destaca-se a água do criatório, que é um dos fatores mais importantes no setor aquícola. A água ideal do ranário deve apresentar baixa contagem de coliformes totais não conter excesso de matéria orgânica, não ser poluída e ter pH entre 6,5 e 7,5 (CRIBB et al., 2013). Tais recomendações exigem um manejo cuidadoso, sobretudo pelo fato de as rãs trocarem de pele e excretarem na água das baias, o que aumenta a quantidade de amônia e desregula o pH do meio, o que, além de favorecer a proliferação de microrganismos, é prejudicial para o bem-estar animal na produção. Lima e Agostinho (1992) destacam a necessidade de utilizar instalações adequadas e mantê-las sempre limpas e desinfetadas

periodicamente. Ademais, na ocorrência de doenças, os autores indicam manter o vazio sanitário por um período de 35 dias, em média.

A etapa de jejum pré-abate tem a finalidade de reduzir a contaminação das carcaças. Este deve ocorrer em período adequado (nem muito longo, nem muito curto) para evitar o rompimento das alças intestinais. O Manual de Ranicultura da Embrapa (2013) sugere um tempo mínimo de 24 horas de jejum, porém não estipula um limite máximo. Em contrapartida, Costa et al. (2021) ao avaliarem o impacto de diferentes períodos de jejum na contagem microbiológica de carcaças de rã-touro, observaram que o jejum de 48 a 72 horas foi suficiente para reduzir contagem de aeróbios mesófilos e diminuir a ocorrência de *E. coli* e *Salmonella* spp.

A esfolagem é um ponto crítico de controle, pois erros na sua execução podem ocasionar contaminação cruzada entre pele e musculatura. No abate de rãs essa etapa é feita manualmente. Assim sendo, os funcionários devem ser devidamente treinados para diminuir a incidência de falhas tecnológicas. Em seguida, tem-se a etapa de evisceração, na qual as vísceras são tracionadas a fim de removê-las integralmente (CRIBB et al., 2013). Ao contrário do processo em bovinos e suínos, cujo reto é ocluído antes da evisceração, nas rãs isso não acontece. Logo, o risco de extravasamento de conteúdo fecal é maior. Alfani (2007) observou aumento de $\pm 75\%$ na ocorrência de *Salmonella* após a evisceração, afirmando, ainda, que o aumento da manipulação durante o abate provocava aumento no número de amostras positivas.

Tendo em vista as singularidades do manejo pré-abate e abate das rãs, percebe-se a necessidade de monitoramento dessas etapas. Nesse contexto, uma das formas de monitoramento é a avaliação da qualidade microbiológica das carcaças, no intuito de fornecer um produto seguro para o consumidor. Essa avaliação pode ser feita contando-se microrganismos indicadores de higiene, como bactérias aeróbias mesófilas e coliformes a 35°C, bem como patógenos, como a *E. coli*. No presente trabalho buscou-se identificar os microrganismos supracitados e bactérias do gênero *Salmonella*, cujo potencial patogênico é reconhecido mundialmente, sendo um motivo de preocupação à saúde pública.

2.5 Investigação de microrganismos indicadores de higiene e *Salmonella* spp.

A contaminação das carcaças durante o abate é um fator inevitável ao processo, visto que a carne, inicialmente estéril, pode entrar em contato direto com a pele e/ou

conteúdo fecal dos animais abatidos. Nesse contexto, os microrganismos indicadores, como aeróbios mesófilos (AM), coliformes a 35°C (C35) e coliformes a 45°C, são utilizados na microbiologia de alimentos para indicar as condições gerais de higiene no local de abate (instalações, trabalhadores e ambiente), enquanto a *Escherichia coli* (EC) está potencialmente correlacionada com a contaminação fecal. Em bovinos, foi relatado que a contagem de aeróbios mesófilos pode aumentar após a evisceração e diminuir após a lavagem da carcaça (MILIOS; DROSINOS; ZOIPOULOS, 2014) e que a ocorrência de contaminação cruzada é influenciada pela estrutura do sistema de abate, pelos operadores e pelo grau inicial de limpeza do ambiente (BACON et al., 2000).

No que diz respeito à qualidade microbiológica da carne de rã, a contagem de AM é utilizada, porém não são descritos limites na legislação brasileira. Desse modo, habituou-se a utilização de padrões internacionais descritos no *Codex Alimentarius*, no qual o limite máximo permitido é 5×10^6 UFC/g (Food Administration Manual, 1995).

Os padrões microbiológicos para alimentos no Brasil, estabelecidos anteriormente pela Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 12 de 2001 (ANVISA, 2001), limitavam a presença de estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp. na carne de rã “in natura” em 10^3 UFC/g e ausência em 25g, respectivamente. Em 2022, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA através da Instrução Normativa (IN) nº 161 estabeleceu novos padrões, sendo que no texto atual não mais se encontra a carne de rã, porém o Art. 3º ressalta que, para os produtos não explicitamente categorizados, deve ser considerada a similaridade da natureza do alimento e do processo de fabricação. Logo, entende-se que, em concordância com o RIISPOA (BRASIL, 2017), os anfíbios entram na categoria de pescado. Isto posto, para os pescados e miúdos os limites máximos de *Salmonella* e *Estafilococos* permaneceram os mesmos, sendo acrescentada *Escherichia coli* para produtos não consumidos crus, cujo limite é 5×10^2 UFC/g (ANVISA, 2022).

Sabe-se que, os microrganismos indicadores de higiene são bastante úteis na determinação da qualidade do alimento, porém não são suficientes para constituir uma análise de risco completa para os consumidores. Segundo Da Silva et al. (2017), um alto índice desses microrganismos pode estar, em certas circunstâncias, relacionado com uma maior probabilidade de presença de patógenos entéricos, porém, frequentemente não está. Mas sua ausência nem sempre significa que os alimentos estejam livres de patógenos. Desse modo, é inevitável analisar patógenos, sobretudo do gênero *Salmonella*, responsável por milhares de infecções de origem alimentar por ano (CDC, 2022).

As rãs são consideradas reservatórios naturais de *Salmonella* spp., tornando-se importantes na epidemiologia da doença que essa bactéria pode causar, a salmonelose (NICKELSON et al., 1975; SHARMA; KAURA; SINGH, 1974; ALFANI, 2007; BARREIRA et al., 2011). Nickelson e colaboradores (1975), encontraram 22% de positividade em intestinos e fígados de rãs, porém não detectaram a bactéria no tecido muscular, concluindo que a presença da *Salmonella* spp. na carne advinha de contaminação cruzada durante o processo de abate. Sharma, Kaura e Singh (1974) detectaram *Salmonella* spp. no intestino de dezoito (14%) das 129 rãs avaliadas. Já Barreira et al. (2011) isolaram a bactéria em apenas 10% das amostras (3/30).

A presença de *Salmonella* em anfíbios é considerada assintomática, porém condições sintomáticas são evidenciadas em humanos como resultado de transmissão por esses animais. Alfani (2007) detectou 26,7% de positividade em amostras coletadas da água de um ranário e 40% em carcaças prontas para o consumo. Além disso, o autor chamou atenção para a capacidade da bactéria se aderir à pele dos animais e que eram necessárias investigações quanto à quantidade ideal de cloro a ser utilizado durante a insensibilização, objetivando-se contribuir para a sua redução.

2.6 Aspectos legais do abate e processamento de rã

No Brasil, a rã é classificada como pescado pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA, instituído pelos Decretos nº 9.013 de 2017 e nº 10.468 de 2020 (BRASIL, 2017; 2020), devendo ser abatida e processada sob regime de inspeção oficial e seguindo os preceitos de abate humanitário e controle higiênico-sanitário das legislações vigentes. O RIISPOA discorre acerca das características sensoriais esperadas na carne de anfíbios e delibera sobre o caráter permanente da inspeção no *ante* e no *post mortem* destes animais, diferentemente do que acontece em outros tipos de pescado como peixes, crustáceos e moluscos, cuja inspeção possui caráter periódico.

Em acréscimo à legislação, foram publicados dois manuais técnicos sobre o tema, o Manual Técnico da Ranicultura (CRIBB et al., 2013) e o Manual Técnico de manipulação e conservação de pescado (CRIBB et al., 2018). Além disso, a Portaria nº 365 de 2021 (BRASIL, 2021) estabelece que o pescado deve ser tratado com métodos humanitários tanto no manejo pré-abate quanto no abate. Entretanto, há escassez de informações inerentes às especificidades destas etapas, como a concentração ideal de

cloro a ser usada para garantir seguridade microbiológica sem ferir, contudo, o bem-estar animal. Em virtude da ausência de uma padronização de parâmetros para essa espécie são utilizadas extrapolações do que é feito com outros animais, o que gera lacunas no conhecimento e coloca em risco a segurança do alimento produzido.

No caso do uso de cloro na lavagem dos animais antes do abate, há na legislação diferentes valores para cada espécie: 15 ppm para bovinos, 5 ppm para aves e suínos (BRASIL 1995; 1998; MAPA, 2007). No entanto, para rãs não há um valor definido em legislação e, considerando a recomendação dada pela Portaria nº 365 de 2021, publicações científicas são utilizadas como base.

Nickelson et al. (1975) descreveram o uso de 200 ppm de cloro em um tanque de água gelada na etapa de insensibilização de rãs. Enquanto Loaiza (1996) utilizou 150 ppm de cloro residual livre para lavagem de rãs, as quais permaneciam imersas na água clorada por 5 a 10 minutos. Já Mello (2009), em concordância com Seixas-Filho et al. (2017) e Cribb et al. (2018), indicam 125 ppm. Em contrapartida, Afonso et al. (2016) utilizaram o valor de 5 ppm de cloro, o que coincide com a concentração usada para suínos e aves (BRASIL, 1995; 1998). Faz-se necessário, portanto, a promoção de novos estudos científicos que abordem essa temática e venham a servir como fundamento às leis, como é o caso do presente trabalho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de coleta

A coleta das amostras foi realizada no abatedouro frigorífico experimental de rãs da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, que se encontra anexo ao ranário, cujo sistema de criação é intensivo e compreende desde a fase de girino até a fase adulta. As coletas aconteceram nos meses de junho e julho, inverno no Brasil. As rãs foram alimentadas com ração de truta e abatidas com idade entre quatro e seis meses, e com peso médio de 317,66 gramas ($\pm 50,37$). Todos os procedimentos executados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) sob o protocolo SEI/UFU – 3601717/2022.

3.2 Caracterização dos grupos

Foram utilizados 71 animais, divididos em quatro grupos de experimentação (Grupo A – D), todos oriundos de uma mesma baía de engorda, estando, portanto, sob as mesmas condições ambientais e de contaminação pré-abate. Estes foram submetidos a um período de jejum de 48 horas (COSTA et al., 2021), no qual permaneceram em uma baía limpa e com água corrente. Em seguida, os animais foram levados para a sala de abate e colocados dentro de baldes contendo 10 litros de água sem cloração.

O grupo A foi o controle negativo, no qual não houve acréscimo de cloro. Os demais grupos tiveram uma proporção de cloro granulado adicionada à água, respectivamente, 5, 65 e 125 ppm (partes por milhão) do produto utilizado no estabelecimento (tabela 1). O tempo de exposição às condições experimentais foi pré-estabelecido em 10 minutos (CRIBB et al., 2018; MELO, 2009). As proporções de cloro selecionadas levaram em consideração trabalhos e manuais técnicos da área.

Passados os 10 minutos, os animais eram retirados dos baldes, insensibilizados por eletronarcose e sangrados conforme legislação vigente no país, seguindo a Portaria nº 365/2021 e o Decreto nº 9.013/2017. Foram determinados dois pontos de coleta: pós-sangria (A) e pós-toaleta (B). Logo após a sangria, os animais eram pesados em balança manual e as carcaças passavam pela técnica de enxágue fixo superficial, na qual cada carcaça era imersa em saco estéril contendo 100ml de solução NaCl 0,85%, sendo massageada durante 30 segundos antes de ser retirada. Processo idêntico era feito após a toaleta. As amostras obtidas foram mantidas refrigeradas em caixa térmica de isopor com gelo até a chegada ao laboratório, onde foram executadas as análises.

Tabela 1 – Divisão dos grupos experimentais em A, B, C e D, com 0, 5, 65 e 125 ppm de cloro adicionados a 10L de água, respectivamente, aos quais as rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) foram submetidas.

Grupos	Condições Experimentais	Quantidade de animais
A	10L de água (grupo controle)	18
B	10L de água + 5 ppm de cloro	18
C	10L de água + 65 ppm de cloro	18
D	10L de água + 125 ppm de cloro	17
	Total	71

3.3 Análises Microbiológicas

As amostras foram analisadas no Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, seguindo procedimentos padrões de identificação microbiológica, método Petrifilm AOAC 998.08 para C35 e *E. coli*, (BRASIL, 2005); método de contagem padrão em placas para AM (APHA, 1992) e ISO 6579 para *Salmonella* spp. (ISSO, 2002).

3.3.1 Contagem de microrganismos indicadores de higiene

Para avaliação de AM, 1 ml de cada amostra foi homogeneizada com PCA (*Plate Count Agar*) em placas de Petri estéreis através do método *pour plate* (inoculação em profundidade) e incubadas a 37°C, por 48 horas. A contagem das colônias foi ajustada levando em consideração o peso (gramas) da carcaça. Para este ajuste o seguinte cálculo foi aplicado:

$$UFC/g = \frac{ml}{p/v}$$

Sendo:

mL= UFC/ml

p = peso da carcaça avaliada

v = volume constante de 100mL do saco de enxágue

Para a contagem de C35 e EC as amostras foram inoculadas em placas Petrifilm™ EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, e incubadas em estufa a 35°C por 24 e 48 horas. Sendo a faixa de contagem total em Petrifilm de 15 a 150 colônias. Foram considerados como coliformes a 35°C as colônias que se apresentaram vermelhas ou azuis e que produziram gás. Já para *E. coli* foi considerado apenas as colônias azuis produtoras de gás. As contagens obtidas foram ajustadas levando em consideração o peso (gramas) das carcaças, como descrito anteriormente.

3.3.2 Identificação de *Salmonella* spp.

Para o isolamento de *Salmonella* spp., 25 ml de cada amostra foram transferidos para um frasco estéril contendo 225 ml de água peptonada tamponada à 1%, sendo os frascos incubados em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período, uma alíquota de 1 ml de cada frasco foi transferida, com o auxílio de pipetador automático, para um tubo contendo 10 ml de caldo de enriquecimento seletivo *Selenito Cistina* e 0,1 ml para tubo contendo 10 ml de caldo *Rappaport Vassiliadis*. Os caldos foram incubados a 37°C e 41,5°C por 24 horas, respectivamente.

Posteriormente, foi feita a semeadura do conteúdo dos caldos em placas de Ágar XLD e Bismuto Sulfito, as quais foram incubadas por 24 horas a 37°C. As colônias típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas a provas bioquímicas utilizando-se os ágaros LIA (*Lisina Iron Agar*) e TSI (*Triple Sugar Iron*), ambos incubados a 37°C por 24 horas. Foram consideradas como típicas as reações de TSI que apresentaram produção de H₂S, ápice alcalino, base ácida e produção de gás. Já para a LIA foi considerado como típico os tubos com ápice e base alcalinos, com presença ou não de gás e produção de H₂S. As reações típicas de LIA e/ou TSI foram transferidas para tubos com 10 ml de BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) e incubadas em estufa 37°C/24 horas. Por fim, 0,9 ml do conteúdo dos tubos foram adicionados a microtubos (duplicatas) com 0,1 ml de glicerol, sendo congelados para posterior confirmação por metodologia molecular, PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

A confirmação dos isolados suspeitos por PCR teve como alvo os genes *ompC* e *invA* (SWAMY et al., 1996; ALVAREZ et al., 2004; SKYBERG et al., 2006), sendo o primeiro envolvido na produção de proteínas estruturais da membrana externa de *Salmonella* spp. e o segundo relacionado à sua virulência. A condição de amplificação dos genes foi de 93°C por 5 minutos, 30 ciclos de 93°C por 1 min., 42° C por 1 min., 72° C por 2 min., e um extensão final a 72° C por 5 min. As colônias suspeitas foram submetidas à extração e purificação de DNA. Uma cepa de *Salmonella* spp. ATCC foi usada como controle positivo e água ultra pura como negativo. O volume final da reação foi de 25µL, composto por 1 µL de DNA, 1,25 µL de 10 pmol/ µL da sequência forward e reverse de cada primer, 10,25 µL de água ultrapura, 12,5 µL de Taq Green. As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos de amplificação: desnaturadas inicialmente a 94°C por 5 minutos, amplificadas em 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos,

anelamento a 58°C por 30 segundos (*invA*); extensão por 72°C por 90 segundos, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.4 Análises Estatísticas

Os resultados microbiológicos foram tabulados, inicialmente, em planilhas do Microsoft Excel. Para AM, os resultados foram convertidos em \log_{10} UFC/g e comparados por análise de variância (ANOVA) com teste Tukey's de múltiplas comparações, quanto a diferenças entre as amostras de cada grupo (0, 5, 65 e 125 ppm de cloro) nos pontos de coleta A e B, respectivamente ($P < 0,05$). Para comparar as contagens obtidas entre as etapas A e B foi utilizado o Teste t pareado ($P < 0,05$). Para C35, considerou-se as contagens originais (UFC/g) sendo os tratamentos na etapa A e B comparados pelo teste Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Para comparar as contagens para C35 obtidas entre as etapas A e B foi utilizado o Teste de Wilcoxon pareado ($P < 0,05$).

Por fim, foram consideradas as amostras de C35 cujos valores fossem ≥ 1 UFC/g, enquanto para *E. coli*, devido a baixa contagem vista em trabalhos anteriores e neste, considerou-se os valores $> 0,0$ UFC/g. As comparações de frequência de positividade de coliformes a 35°C, *E. coli* e *Salmonella* spp. foram feitas pelo teste exato de Fisher ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

As contagens médias de AM sob as diferentes concentrações de cloro variaram de 2,0 ($\pm 0,59$) a 2,4 ($\pm 0,60$) log UFC/g na etapa pós-sangria (ponto A) e de 1,6 ($\pm 0,85$) a 2,5 ($\pm 0,90$) log UFC/g no pós-toaleta (ponto B) (tabela 2). Não foi observado impacto do cloro na contagem de AM na etapa A do abate ($P > 0,05$). Já no ponto B do abate, as concentrações de 65 e 125 ppm de cloro resultaram em menores contagens de AM em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Não houve redução nas contagens de AM entre os pontos de coleta A e B em nenhum dos tratamentos aplicados.

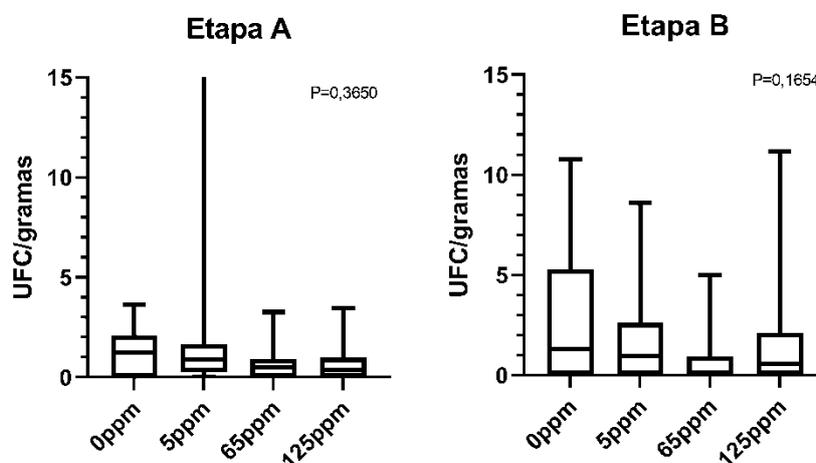
Tabela 2. Contagem de bactérias aeróbias mesófilas (log UFC/gramas) em amostras de carcaças de rãs-touro submetidas a diferentes concentrações de cloro na etapa pré-insensibilização e coletadas em dois pontos do processo de abate em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG.

Tratamentos	n	Etapa de Abate*	
		A	B
0	18	2,4 ($\pm 0,60$) ^{a,A}	2,5 ($\pm 0,90$) ^{a,A}
5	18	2,3 ($\pm 0,61$) ^{a,A}	2,3 ($\pm 1,00$) ^{a,b,A}
65	18	2,0 ($\pm 0,59$) ^{a,A}	1,7 ($\pm 0,76$) ^{b,A}
125	17	2,1 ($\pm 0,48$) ^{a,A}	1,6 ($\pm 0,85$) ^{b,A}

*Etapa A: pós sangria; Etapa B: pós-toaleta **letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma coluna; ***letras maiúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma linha

Já para o grupo dos coliformes a 35°C, o uso do cloro não resultou em redução das contagens, bem como não houve diferença entre as etapas de coleta A e B do abate (Figura 2) ($P > 0,05$).

Figura 2. Contagem total (mediana, mínimo e máximo) de coliformes a 35°C em amostras de carcaças de rãs-touro submetidas a diferentes concentrações de cloro na etapa pré-abate e coletadas em dois pontos do processo de abate em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG. Etapa A: pós sangria; Etapa B: pós-toaleta



Além das baixas contagens de C35, identificou-se apenas 38% de amostras positivas (54/142), variando entre 23,5% (4/17) e 61,1% (11/18), nos tratamentos com 125 e 0ppm de cloro respectivamente. Apesar dessa variação, o uso do cloro não influenciou a ocorrência de C35 entre os tratamentos e entre as etapas do abate ($P > 0,05$).

Assim como para C35, na avaliação do uso do cloro sobre a presença de *Escherichia coli* em carcaças de rã-touro não houve diferença entre os pontos A e B, bem como entre os diferentes tratamentos com cloro ($P > 0,05$). Além disso, houve uma baixa

ocorrência de *E. coli* nas amostras analisadas (6/142), com frequência variando entre zero (0/18) e 11,8% (2/17).

Semelhantemente, a ocorrência de *Salmonella* spp. nas carcaças de rã-touro exibiu valores baixos, variando de 5,6% (1/18) a 16,7% (3/18), de tal modo que não foi observada interferência do cloro sobre os resultados ($P > 0,05$). Nota-se que apenas as amostras obtidas na etapa A dos tratamentos de 5 e 65ppm não apresentaram positividade para *Salmonella* spp. (tabela 4). Dentre o total de amostras positivas para *Salmonella* spp., quatro foram oriundas da etapa A e seis da etapa B do abate.

Tabela 4. Frequência de Coliformes 35°C, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em amostras de carcaças de rãs-touro submetidas a diferentes concentrações de cloro em dois pontos de coleta no abate (ponto A: após sangria e ponto B: após a toailete), em um abatedouro-frigorífico de Uberlândia-MG.

Tratamentos	n	Etapas do abate				Valor de P
		A		B		
		Positivos	%	Positivos	%	
<i>Coliformes a 35°C</i>						
0	18	11 ^a	61,1	10	55,6	>0,9999
5	18	8 ^{a,b}	44,4	9	50,0	>0,9999
65	18	4 ^b	22,2	4	22,2	>0,9999
125	17	4 ^b	23,5	4	23,5	>0,9999
Valor de P		0,0501		0,0763		
<i>Escherichia coli</i>						
0	18	0	0	1	5,6	>0,9999
5	18	2	11,1	0	0	0,4857
65	18	0	0	0	0	>0,9999
125	17	1	5,9	2	11,8	>0,9999
Valor de P		0,2824		0,2556		
<i>Salmonella</i> spp.						
0	18	3	16,7	1	5,6	0,1774
5	18	0	-	2	11,1	0,2286
65	18	0	-	1	5,6	>0,9999
125	17	1	5,9	2	11,8	>0,9999
Valor de P		0,0991		0,8504		

*letras minúsculas sobrescritas indicam diferença estatística entre os valores de uma mesma coluna;

5. DISCUSSÃO

No Brasil, apesar do abate de rãs constar no RIISPOA, há escassez de informações sobre as especificidades deste processo, como a concentração ideal de cloro a ser usada na lavagem pré-insensibilização. O cloro possui função sanitizante, sendo amplamente utilizado na indústria de pescados com intuito de reduzir a carga microbiana tanto na matéria-prima, quanto em superfícies e utensílios (SCHERER et al., 2004). Sua propriedade bactericida, somada ao seu baixo custo e facilidade de aplicação, fizeram do cloro e seus compostos o desinfetante mais comum na área de alimentos (SILVA et al., 2010). Ao entrar em contato com a água, o cloro forma íons hipoclorito e ácido hipocloroso, o qual é considerado a forma mais ativa e letal para microrganismos. Porém, alguns fatores tornam sua ação menos efetiva, como alta concentração de matéria orgânica, pH acima de 8,5, tempo de ação insuficiente, armazenagem incorreta, entre outros (CODEX ALIMENTARIUS, 1988; CRIBB et al., 2018).

Nesse contexto, os tipos de ranários podem interferir na quantidade de cloro necessária para garantir diminuição da contaminação microbiológica no pré-abate. Uma vez que as criações intensivistas são caracterizadas por alta densidade, e a água em constante contato com os animais, somada ao excesso de matéria orgânica e restos de pele, favorece a proliferação de microrganismos. Caso não haja um manejo assíduo do local, a qualidade da água do criatório fica prejudicada (MAZZONI et al., 1995; FERREIRA, 2003). Ainda não há na literatura trabalhos que correlacionem os diferentes tipos de produção ao uso de mais ou menos quantidades de cloro. Entretanto, tendo em vista que a qualidade da água é diretamente proporcional ao efeito positivo desse agente, os sistemas cujas condições favoreçam maiores alterações nos parâmetros físico-químicos da água irão tender a um aumento no uso de cloro na lavagem pré-abate das rãs.

Vale ressaltar que o uso indiscriminado de cloro não pode compensar a falta de higiene em uma planta de processamento (CODEX ALIMENTARIUS, 1988), portanto, é necessário unir boas práticas de fabricação a estudos científicos para se alcançar um consenso quanto as taxas ideais. Nesse contexto, vários autores citam o uso do cloro na lavagem pré-abate de anfíbios, mas não apresentam no texto as condições anteriores a esta etapa nem o correlacionam com a contaminação microbiológica da carcaça (LOAIZA, 1996; MELLO, 2009; SEIXAS-FILHO, 2017). No presente trabalho, com base nos resultados do grupo controle, nota-se que os animais já adentram a planta do

abatedouro com uma baixa carga microbiana, o que é um reflexo das boas condições higiênicas do manejo pré-abate dessas rãs.

Na prática, para o abate de anfíbios, são usadas extrapolações de outras espécies, como suínos e frangos, o que pode colocar em risco a inocuidade do produto, pois não são consideradas as particularidades da espécie, como trato digestivo e pele (CRIBB et al., 2013).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (1988), o limite máximo permitido de cloro residual livre na água para pescado é de 10 ppm, visto que excessos causam alterações sensoriais no produto final. No Brasil, o Manual Técnico de Ranicultura (2013) não apresenta qual concentração de cloro deve ser usada no pré-abate, porém indica o uso de água hipoclorada a 5 ppm ao longo da nória até o final da limpeza das carcaças, a fim de contribuir com a higiene dos procedimentos. Em 2018, o Manual Técnico de Manipulação e Conservação do Pescado (2018) passa a recomendar o valor de 125 ppm de cloro adicionados à água, juntamente com sal e gelo no processo de insensibilização, concordando com Mello (2009) e Seixas-Filho (2017).

Anteriormente, Loaiza (1996) descreveu o uso de 150 ppm e Nickelson et al. (1995), 200 ppm. No entanto, este último trabalho visava investigar a presença de *Salmonella* spp. em músculo de pernas de rã através de dissecação asséptica, o que poderia explicar a quantidade exorbitante de cloro em contato com a pele, visando mitigar contaminação cruzada. Segundo Minozzo (2011), a água utilizada para o consumo direto ou no preparo/manipulação do pescado deve ser potável e de preferência clorada a 5 ppm. Esse valor está em concordância com o trabalho de Afonso et al. (2016) e com a concentração usada no abate de suínos e aves no Brasil (BRASIL, 1995; 1998).

No presente trabalho, não houve efeito das diferentes quantidades de cloro sobre a contagem de C35, nem sobre a presença de *E. coli*, tanto na pele (pós-sangria) quanto na carcaça pós-toaleta. Ademais, detectou-se baixa ocorrência de C35 nas amostras analisadas, o que difere do valor encontrado por Barreira et al. (2011), de 70% (21/30) de frequência de coliformes totais em carne de rã-touro comercializada no Rio de Janeiro, RJ.

Embora não haja indicação limítrofe de C35 na legislação, é importante verificar a quantidade desses microrganismos nos alimentos, pois são bons indicadores de intervenções sanitárias no sistema, na medida que sofrem efeito de sanitizantes como cloro. Um alto índice de coliformes pode estar relacionado a más condições de higiene nos processos de fabricação ou contaminação pós-processamento (DA SILVA, 2017).

Portanto, como foi encontrada uma baixa quantidade de coliformes a 35°C, pode-se concluir que tanto a matéria-prima quanto as condições de higiene durante a produção foram adequadas.

Para AM, nota-se uma possível tendência de redução, em termos absolutos, conforme a concentração de cloro aumenta na etapa A, apesar de estatisticamente não ter sido constatada diferença. Já na etapa B, houve redução na contagem de AM nos grupos tratados com 65 e 125ppm em relação ao grupo controle. Uma causa presumível para esse efeito pode estar relacionada a uma ação prolongada do cloro na pele destes animais. Contudo, ainda na etapa B, o tratamento de 5 ppm apresentou-se estatisticamente semelhante tanto ao grupo controle quanto aos grupos tratados com 65 e 125 ppm, podendo, então, ser esta menor concentração recomendada para a lavagem pré-insensibilização das rãs com efeito na redução de AM.

Scherer et al. (2004) ao analisarem o efeito do gelo clorado (5 ppm) sobre parâmetros microbiológicos de carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) observaram efetiva redução na contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. Desse modo, é possível fazer um paralelo entre a água clorada usada na lavagem pré-abate de anfíbios e o gelo clorado utilizado na insensibilização de peixes, visto que o propósito de utilização do cloro é o mesmo e ambos são considerados “pescado” na legislação brasileira.

Rodrigues et al. (1994) encontraram em carnes de rãs congeladas contagens superiores à do presente trabalho, variando entre 5,3 e 5,5 log UFC/g de aeróbios mesófilos. Já Mello et al. (2006), ao analisarem carne de dorso e coxa de rã processadas em abatedouros comerciais, registraram contagens entre 5 e 6 log UFC/g. A maior contagem de AM nos trabalhos citados pode estar relacionada a maior manipulação da carne, visto que se referem à carne já processada. Corrêa (1988), por sua vez, identificou valores entre 3,41 e 1,84 log UFC/g em carne de rã fresca e estocada.

Ademais, a quantificação de AM é crucial na indústria alimentícia, pois esses microrganismos podem indicar falhas na cadeia de produção, especialmente relacionadas à limpeza e desinfecção inadequadas das superfícies, à higienização dos manipuladores e condições inapropriadas de armazenamento e temperatura durante a produção e conservação dos alimentos (DA SILVA, 2017).

Uma vez que a legislação brasileira não discorre acerca dos limites permitidos para aeróbios mesófilos em carne de rã, o *Codex Alimentarius* é o padrão comumente

seguido. Assim sendo, nenhuma das amostras analisadas neste trabalho ultrapassou a contagem máxima permitida, de 5×10^6 UFC/g.

Em termos práticos, do ponto de vista microbiológico e econômico, a concentração de 5 ppm de cloro é suficiente para alcançar resultados satisfatórios em relação a AM, sendo indiferente para C35 e *E. coli*. Tendo em vista que 5 ppm apresenta redução estatisticamente semelhante aos tratamentos mais altos, têm-se o melhor custo-benefício ao usá-lo.

Houve um aumento de $\pm 67\%$ de ocorrência de *Salmonella* spp. após as etapas de esfolagem e evisceração. Tais resultados estão em concordância com aqueles encontrados por Alfani (2007), cuja pesquisa apontou aumento de $\pm 75\%$ na ocorrência do patógeno após a evisceração. O autor afirma que o aumento da manipulação durante o abate é responsável pelo acréscimo nas amostras positivas.

No entanto, a frequência encontrada neste estudo foi relativamente baixa quando comparada a de outros autores (NICKELSON et al., 1975; YDE et al., 1985; SILVA, OLIVEIRA, 1994; RODRIGUES et al., 1994; ALFANI, 2007). Já o trabalho de Costa et al. (2021), encontrou frequência semelhante ao presente trabalho (10/140).

Nickelson e colaboradores (1975), encontraram 22% de positividade em intestinos e fígados de rãs, porém não detectaram a bactéria no tecido muscular, concluindo que a presença da *Salmonella* spp. na carne advinha de contaminação cruzada durante o processo de abate. Já o trabalho de Yde et al. (1985), encontrou 71% de positividade em rãs da Bélgica. Silva e Oliveira (1994) avaliaram amostras de carne de rã congelada advindas de abatedouro doméstico e industrial, encontrando 21,2% de ocorrência de *Salmonella* spp. no abatedouro doméstico e nenhuma ocorrência no abatedouro industrial. Já Rodrigues et al. (1994) detectaram 29 amostras positivas dentre as 30 analisadas (97%).

Alfani (2007) detectou 26,7% de positividade em amostras coletadas da água de um ranário e 40% em carcaças prontas para o consumo. O percentual de frequência de amostras positivas para *Salmonella* spp. nesta pesquisa foi menor que os percentuais dos autores supracitados. Através destes resultados, é possível perceber que, historicamente, os avanços higiênico-sanitários têm contribuído para a redução da ocorrência do patógeno, porém ainda há muito a ser feito, considerando-se as especificidades das rãs.

Salmonella spp. não foi identificada nos tratamentos com 5 e 65 ppm de cloro da etapa A. Apesar disso, a ausência de positividade nesses grupos não foi suficiente para apontar uma diferença estatística em relação ao tratamento controle. Contudo, observa-se que o valor de P indica uma tendência de redução, a qual poderia ser observada com um

n maior de amostras. Esses resultados reforçam a importância de trabalhos científicos que avaliem a qualidade microbiológica dessa carne sob um ponto de vista prático, sobretudo em se tratando de um patógeno de grande importância para a saúde pública e segurança alimentar (COSTA et al., 2021; CDC, 2022)

Por fim, os dados obtidos podem contribuir com a ricultura nacional, no intuito de mitigar os impactos negativos da ausência de especificações sobre o abate e pré-abate de anfíbios, com constatações concretas alcançadas por meio de investigação científica, as quais podem servir como complementação e suporte às legislações.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que, no intuito de indicar qual a concentração de cloro mais condizente com a realidade dos ranários e abatedouros-frigoríficos do país, atentando-se aos requisitos microbiológicos e aspectos econômicos envolvidos, o valor de 5 ppm é o mais adequado para ser utilizado na água de lavagem de rãs-touro na etapa de pré-abate, sendo este suficiente para reduzir a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, manter sob controle as contagens de coliformes a 35°C e a baixa presença de *E. coli* e *Salmonella* spp. nas carcaças analisadas.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, A.M.; CRIBB, A.Y. A ranicultura brasileira de 2000 a 2015: um breve relato de fatos. **Aquaculture Brasil**, 1ª ed., p. 32-35, 2016.
- ALFANI, R. **Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças e vísceras de rãs (*Rana catesbeiana* - Rã Touro): avaliação do processo de abate**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007.
- ALTHERR, S.; GOYENECHEA, A.; SCHUBERT, D.J. Canapés to extinction: The international trade in frog's legs and its ecological impact (eds). **A report by Pro Wildlife, Defenders of Wildlife and Animal Welfare Institute**. Munich (Germany), Washington, D.C. (USA), p.20, 2011.
- ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A.B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1734-1738, 2004. s
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022**. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Ministério da Saúde, D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, p. 235, Brasil, 2022. Disponível em: < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-161-de-1-de-julho-de-2022-413366880> >. Acesso em: 06 dez. 2022.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde, D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001, Brasil, 2001. Disponível em: < [título: \(anvisa.gov.br\)](http://titulo.anvisa.gov.br) >. Acesso em: 14 out. 2022.
- APHA. American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3. ed. Washington, 1219 p., 1992.
- AYRES, A. A. C. et al. Carcass yield and proximate composition of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 37, n. 4, p. 329, 1 out. 2015.
- BACON, R. T. et al. Microbial populations on animal hides and beef carcasses at different stages of slaughter in plants employing multiple-sequential interventions for decontamination. **Journal of food protection**, v. 63, n. 8, p. 1080–1086, 2000.
- BARTLETT, K.H.; TRUST, T.J.; LIOR, H. Small pet aquarium frogs as a source of *Salmonella*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1026- 1029, 1977.
- BARREIRA, V.B; MESQUITA, E.F.M.; FRANCO, R.M.; MELLO, S.C.R.P. Análise bacteriológica da carne de rã-touro comercializada no município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, v.25, n. 202/203, p. 145-150, novembro, 2011.
- BRASIL. Decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 mar. 2017.

BRASIL. Instrução Normativa nº 40, de 12 de dezembro de 2005. Aprova os Métodos Analíticos, Isolamento e Identificação da Salmonella na carne bovina, avicultura e produtos derivados de ovos - MLG - 4.03, Metodologia Alternativa de Salmonella A-Bax -MLG 4C .01, Isolamento e Identificação de Listeria monocytógenes em carne vermelha, carne de ave, ovos e amostras ambientais, MLG 8.04 - Metodologia Alternativa de Listeria A-BAX MLG-8 A .01, Escherichia coli, MPN AOAC 966.24, Método Petrifilm AOAC 998.08, que passam a constituir Padrões Oficiais para Análise de Microbiologia de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Ministério da agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 16 dez. 2005, Seção 1, p 70.

BRASIL. Portaria nº 365 de 16 de julho de 2021. Aprova o Regulamento Técnico de Manejo Pré-abate e Abate Humanitário e os métodos de insensibilização autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 set. 2021.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2022. Salmonella Homepage. Previous Outbreaks. Disponível em: < [Outbreaks Involving Salmonella | CDC](#) >. Acesso em: 18 jan. 2023.

CODEX ALIMENTARIUS. **CODEX COMMITTEE ON FISH AND FISHERY PRODUCTS**. Discussion paper on the use of chlorinated water. Presented at the 24th session of the CCFFP. June, 2000, paper CX/FFP 00/13, 2000.

CORRÊA, A. L. S. **Avaliação composicional de diversas espécies de rãs e efeitos de armazenamento a 18°C, sobre frações proteicas e lipídicas do músculo de rãs touro (Rana catesbeiana)**. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 123 p. 1988. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, 1988.

COSTA, P.C.; NASCIMENTO, Y.F.; COSTA, L.R.M.; DIAS, S.C., VENTURA, N.K.O.; YAMATOGLI, R.S.; COSTA, F.A.A; COSSI, M.V.C. Influence of different periods of pre-slaughter fasting on microbiological quality of bullfrog carcasses (*Lithobates catesbeianus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, n. 2, p. 487-494, 2021. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abmvz/a/BTmhBGVYjjpgCrBb78RCFSbp/>>. Acesso em 05 mai. 2022.

CRIBB, A.Y.; AFONSO, A.M.; MOSTÉRIO, C.M.F. **Manual técnico de ranicultura**. Rio de Janeiro: Embrapa, p. 76, 2013.

DA SILVA, N. et al. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos e água [livro eletrônico]. 5ª edição, São Paulo. **Blucher**, 560p., 2017.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**. Sustainability in action. Rome, p. 244, 2020.

FERREIRA, C. M. A importância da água e sua utilização em ranário comerciais. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 13, n. 79, p 15-17, 2003.

FOOD ADMINISTRATION MANUAL. S.11: **Microbiological Reference Criteria for Food**. Food Management Manual, p.16, 1995.

GRAY, M.J.; RAJEEV, S.; MILLER, D.L.; SCHMUTZER, A.C.; BURTON, E.C.; ROGERS, E.D.; HICKLING, G.J. Preliminary evidence that American Bullfrogs (*Rana*

catesbeiana) are suitable hosts for Escherichia coli O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 12, p. 4066-4068, 2007.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Estatística da pesca 2007. Brasil: Grandes regiões e unidades da federação. Brasília: **IBAMA**, p.113, 2021. Disponível em: < https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/biblioteca/download/estatistica/est_2007_boletim_07_brasil.pdf >. Acesso em: 01 abr. 2022.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579:2002**. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 2002.

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

LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A. **A tecnologia da criação de rãs**. Viçosa, Minas Gerais: UFV, p. 168, 1992.

MAZZONI, R.; CARNEVIA, D.; ALTIERI, W.; MATSUMURA, Y. Cría de ranas em “Sistema Inundado”, experiências em ranários comerciais. In: International Meeting on frog research and technology, 1. **Anais**. Viçosa, MG: Abetra, v. 1, p. 121-122, 1995.

MELLO, S.C.R.P.; PESSANHA, L.S.; MANO, S.; FRANCO, R.M.; PARDI, H.S.; SANTOS, I.F. Avaliação bacteriológica e físico-química da polpa de dorso de rã obtida por separação mecânica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, p. 39-48, 2006.

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

MINOZZO, M.G. **Processamento e Conservação do Pescado**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná – Educação a distância. Ministério Da Educação, Curitiba, 2011.

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

NICKELSON, R.; WYATT, L. E.; VANDERZANT, C. REDUCTION OF *Salmonella* CONTAMINATION IN COMMERCIALY PROCESSED FROG LEGS. **Journal of Food Science**, v. 40, n. 6, p. 1239–1240, 1 nov. 1975.

NÓBREGA, I.C.C.; ATAÍDE, C.S.; MOURA, O.M.; LIVERA, A.V.; MENEZES, P.H. Volatile constituents of cooked bullfrog (*Rana catesbeiana*) legs. **Food Chemistry**, v. 102, p. 186-191, 2007.

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

- OLIVEIRA, L.P.L.; SEIXAS FILHO, J.T.; PEREIRA, M.M.; MELLO, S.C.R.P. Frog meat in special diets: potential for use as a functional food. *Bol. Instituto da Pesca*, v.44, p.44-106, 2017.
- OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J.R; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**. Brasília: FAO, 2008.
- OTTINGER, M. et al. Opportunities and Challenges for the Estimation of Aquaculture Production Based on Earth Observation Data. *Remote Sensing*, v. 10, n. 7, p. 1076, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/rs10071076> > Acesso em: 13 de jan. 2023.
- PAHOR-FILHO, E.; MANSANO, C.F.M.; PEREIRA, M.M.; DE STÉFANI, M.V. The most frequently bullfrog productive systems used in Brazilian aquaculture: a review. *Aquaculture Engineer*, v.87, p.1-10, 2019.
- PAIXÃO, M.P.C.P; BRESSAN, J. Aplicação Terapêutica da Carne de Rã. **Nutrição em Pauta**, v. 94, p. 21-25, 2009.
- RIBEIRO, P.L.; TOLEDO, F.L. An overview of the Brazilian frog farming. *Aquaculture*, v.548, n.2, p. 737623, 2022.
- RODRIGUES, R.L.; LEITE, M.O.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T. Avaliação bacteriológica de carne de rã (*Leptodactylus* sp.) congelada, comercializada em Niterói, RJ. *Higiene Alimentar*, v. 8, n.31, p.19-24, jun. 1994.
- SALVIANO, A.T.M.; BATISTA, E.S.; MOREIRA, R.T. Perfil do consumidor da carne de rã (*Rana catesbeiana*) e produtos derivados. In II Jornada Nacional da Agroindústria, p. 1-4, 2007.
- SEIXAS-FILHO, J.T.; PEREIRA, M.M.; MELLO, S.C.R.P. **Manual de Ranicultura para o produtor**. Fundação Instituto de Pesca do Estado do Rio de Janeiro – FIPERJ. Rio de Janeiro, 155p., 2017.
- SHARMA, V. K.; KAURA, Y. K.; SINGH, I. P. Frogs as carriers of Salmonella and Edwardsiella. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 40, n. 1, p. 171–175, mar. 1974.
- SCHERER, R.; DANIEL, A.P.; AUGUSTI, P.R.; LAZZARI, R.; LIMA, R.L.; FRIES, L.L.M.; RADUNZ NETO, J.; EMANUELLI, T. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.4, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010120612004000400034>. Acesso em: 18 jan. 2023.
- SILVA, G.; DUTRA, P.R.S.; CADIMA, I.M. **Higiene na Indústria de Alimentos**. Ministério da Educação. Secretaria de Educação a Distância. EDUFRPE, 134p., Recife, 2010.
- SILVA, N. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Ocorrência de Salmonela na carne de rã (*Rana catesbeiana*, Shaw – 1803). *Higiene Alimentar*, v. 8, n. 31, p. 36-40, jun., 1994.
- SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Diseases*, v. 50, p. 77-88, 2006.
- SOUSA, R. G. C.; MALTAROLO, R. C. Distribuição geográfica e caracterização da produção de rã-touro *Lithobates catesbeianus* no estado de Rondônia

(Brasil). **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 6, n. 1, p. 45–53, 30 mar. 2019. Disponível em: <<https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/desafios/article/view/4450>>. Acesso em: 6 dez. 2022.

SOUSA, R.M.R.; AGOSTINHO, C.A.; OLIVEIRA, F.A.; ARGENTIM, D.; OLIVEIRA, L.C.; WHESCHLER, F.S.; AGOSTINHO, S.M.M. Recria de rã-touro (*Rana castebeiana*) em tanques rede alojados em viveiros de tilápia. **Arquivo Zootecnia**, v. 59, p.31-38, 2010.

VIEIRA, M. I. **Rãs Criação Prática e Lucrativa (4th ed.)**. São Paulo, Brasil: Livraria Nobel S.A, 1985.

WEICHERT, M. A.; MELLO, S. R. P.; ESPINDOLA, L. M. O consumo de tilápias e rãs nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 102, p. 37-41, 2007.

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