

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA CASTELHANO DE SOUZA

**ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM QUEIJOS E
SALAMES COMERCIALIZADOS EM DUAS CIDADES-SEDE DA COPA DO MUNDO
DE FUTEBOL DE 2014**

CURITIBA

2013

FERNANDA CASTELHANO DE SOUZA

**ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM QUEIJOS E
SALAMES COMERCIALIZADOS EM DUAS CIDADES-SEDE DA COPA DO MUNDO
DE FUTEBOL DE 2014**

Monografia apresentada ao Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a Msc. Elisa H. Uemura Yamanaka

Co-orientadora: Prof^a Dr^a: Patricia R. Dalzoto

CURITIBA

2013

AGRADECIMENTOS

À força maior, que rege os espíritos de todos os seres.

Ao Setor de Ciências Biológicas, Coordenação do Curso de Ciências Biológicas e Secretária Rosane, que através do PROVAR possibilitaram que eu retornasse à Universidade para cursar o Bacharelado.

Às professoras Ida Pimentel e Patrícia Dalzoto, que me concederam a oportunidade de iniciar na Microbiologia.

Às orientadoras Patrícia Dalzoto e Elisa Uemura, pelo apoio irrestrito, incentivo e paciência. Eu não poderia ter escolhido orientadoras melhores.

À Larborclin, pela oportunidade de estágio, aprendizado, auxílio financeiro e para que a realização deste trabalho fosse possível.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, que pacientemente atendiam minhas dúvidas quando tudo era novo para mim.

Aos colegas do Laboratório de Controle de Qualidade da Laborclin, pelo companheirismo e compreensão de ter um trabalho de pesquisa em meio a uma rotina agitada de trabalho, assim como, pelo auxílio na coleta de amostras para este trabalho.

Aos amigos da sala 2, que tornaram tardes de estudos agradáveis.

Aos amigos e membros da ECOS - Empresa Júnior de Biologia da UFPR – pelo companheirismo, apoio, e compreensão nos momentos em que precisei me ausentar.

Ao Claudivã, pelo apoio, carinho, e por ter me ajudado a ter calma, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Paulo e Joana, e aos meus irmãos, Felipe e Francine, por todo o amor, por quem sou e por tudo o que alcancei.

RESUMO

Eventos esportivos, como a Copa do Mundo de Futebol, produzem efeitos significativos nos aspectos ambientais, culturais, econômicos, políticos e sociais nas cidades-sede. A grande circulação de pessoas que a copa do mundo trará para o Brasil, entre outros aspectos, a preocupação na área da saúde. Os alimentos mais envolvidos com surtos são ovos, alimentos mistos e carne vermelha e derivados. As bactérias são os organismos mais envolvidos com surtos alimentares e os agentes etiológicos mais frequentes são *Salmonella* sp, *Staphylococcus* sp e *Bacillus cereus*. O presente projeto teve como objetivo avaliar as condições sanitárias na fabricação de salames e queijos artesanais em Porto Alegre e Curitiba, cidades-sede da Copa do Mundo de 2014, tomando como base a resolução RDC 12 (BRASIL 2001). Foram realizadas contagens de coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva. Ainda foi investigada a presença de *Listeria* sp e *Salmonella* sp. Aproximadamente 66,7% dos queijos e 16,7% de salames analisados, produzidos artesanalmente nas regiões metropolitanas de Porto Alegre e Curitiba, apresentaram-se impróprios para consumo humano. Ao todo doze amostras foram analisadas, seis de queijo e seis de salame. Coliformes totais foram observados em sete das amostras analisadas, embora não existam parâmetros para estes micro-organismos na legislação para os alimentos avaliados. *E. coli* foram isolados de 4 amostras de queijo, sendo que em 3 delas a contagem ultrapassou o limite tolerado pela legislação vigente ($2,7 \log_{10}$ UFC/g). *Staphylococcus* coagulase positiva foram isolados de uma amostra de salame e duas de queijo, provenientes de Curitiba, sempre com valores maiores que $3,7 \log_{10}$ UFC/g amostra, conforme a RDC 12. *Listeria* sp. foram isolados de amostras de queijo de Porto Alegre e salames de Curitiba, entretanto a presença de *L. monocytogenes* não foi confirmada. *Salmonella* sp. foram isoladas de uma amostra de salame de Curitiba. Os alimentos analisados apresentam contaminações por potenciais patógenos humanos, levando à necessidade de se estabelecer critérios mais rígidos na produção e comercialização destes produtos.

Palavras-chave: Coliformes; *E. coli*; *Staphylococcus*; *Listeria* sp.; *Salmonella* sp.; segurança alimentar

ABSTRACT

Competition events, such as the World Cup Football, lead to significant effects in many aspects (environmental, cultural, economic, political and social) in the host cities. Due to the great amount of tourists expected to visit Brazil in 2014, the health surveillance is a major concern. Among the aliments responsible for diseases outbreaks, eggs, mixed aliments, red meat and its derivatives are the most common. Bacteria are often the etiologic agents related to those outbreaks, as *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. and *Bacillus cereus*. We aimed the evaluation of the health conditions in salami and cheese manufacturing in the host cities Porto Alegre and Curitiba, according to RDC 12 (BRASIL, 2001). The quantification of Total Coliforms, *E. coli* and *Staphylococcus* coagulase positive was performed by counting methods. The presence of *Listeria* sp and *Salmonella* sp were also investigated. About 66.7% samples of cheese and 8.3% of salami manufactured in Porto Alegre and Curitiba were improper for human consumption. We observed Total Coliforms in seven samples evaluated, though the parameters were not covered by the current legislation in regard of the analyzed aliments. *E. coli* were isolated from 4 samples of cheese and in 3 of them, the counting was superior to $2.7 \log_{10}$ UFC/g. *Staphylococcus* coagulase positive were obtained from one salami sample and 2 samples of cheese, both from Curitiba and over $3,7 \log_{10}$ UFC/g, according to RDC 12. *Listeria* sp were isolated from Porto Alegre cheese and salami samples, only in Curitiba, however the presence of *L. monocytogenes* was not confirmed. *Salmonella* sp. were observed only in one salami sample, also from Curitiba. The samples evaluated have been contaminated by potential human pathogens and stricter criteria must be established in the legislation regarding their production and commercialization, in order to prevent diseases outbreaks.

Key words: Coliforms; *E. coli*; *Staphylococcus*; *Listeria* sp.; *Salmonella* sp.; food safety.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL	8
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> e coliformes totais	8
2.1.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	9
2.1.3 <i>Listeria</i> spp.	12
2.1.4 <i>Salmonella</i> spp.	12
3 OBJETIVOS	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. ÁREA DE ESTUDO	15
4.2. COLETA, TRANSPORTE E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS	15
4.3. ISOLAMENTO PRIMÁRIO - ETAPA COMUM	15
4.3.1 Isolamento de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	17
4.3.2 Isolamento de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	18
4.4 ISOLAMENTO PRIMÁRIO DE <i>Listeria</i> spp.	21
4.5 ISOLAMENTO PRIMÁRIO DE <i>Salmonella</i> spp.	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS	23
5.2 QUANTIFICAÇÃO DE <i>E. coli</i>	25
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVA	27
5.4 PESQUISA DE <i>Listeria</i> spp.	29
5.5 PESQUISA DE <i>Salmonella</i> spp.	29
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Em 2014 o Brasil sediará a Copa do Mundo FIFA (Federação Internacional de Futebol). Os jogos serão disputados em doze cidades-sede, contemplando as cinco regiões do país.

Matias (2008) define cidade-sede como a uma cidade que passou por todo o processo de planejamento do evento e foi eleita para receber o megaevento esportivo. Assim como foi beneficiada pelas obras e demais relações comerciais estabelecidas a partir do evento ou ônus que possam ter ocorrido.

Os megaeventos esportivos, como a copa do mundo, produzem efeitos significativos nos aspectos ambientais, culturais, econômicos, políticos e sociais nas cidades-sede. Uma série de inter-relações e projetos ao serem implementados causam situações positivas e/ou conflituosas nos vários segmentos da sociedade civil organizada. Os grandes eventos esportivos têm potencial muito significativo para criação de valor nas cidades, visto que a realização de eventos atua, sobretudo na atração de visitantes, aumento do comércio, turismo e serviços. Por outro lado, tais eventos têm também seus riscos, que vão desde a segurança, ao trânsito de veículos, à superlotação de determinadas áreas e à perturbação da vida cotidiana dos habitantes (ROQUE; CARVALHO, 2012).

A grande circulação de pessoas que a copa do mundo trará para o Brasil traz, entre outros aspectos, a preocupação na área da saúde. Entre os documentos que compõem o dossiê para a candidatura do país está à comprovação de atendimento de demanda de “serviços médicos e de saúde”. (MATIAS, 2008). São estes serviços médicos que atenderão possíveis surtos alimentares provocados por micro-organismos patogênicos, comuns em viagens. Visando melhorias e novas oportunidades de negócios, SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas - (RPEGN, 2013) e outras organizações já orientam empresários para o mundial de 2014.

A análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, realizada pela Secretaria de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013) evidencia o panorama de locais, agentes etiológicos e alimentos envolvidos em surtos alimentares no país de 1999 a 2009. O local mais frequente de ocorrência dos surtos alimentares é em residências (45,4%), seguido de restaurantes (19,8%) e instituições de ensino (10,6%). Os alimentos mais envolvidos com surtos são em primeiro lugar ovos e produtos à base de ovos (22,8%), em segundo lugar alimentos mistos (16,3%) e em terceiro lugar, carne vermelha e derivados (11,7%). Leite e derivados está em sétima posição com 7,2% dos casos. As bactérias são os organismos mais envolvidos com surtos alimentares, correspondendo a 41,1% dos casos, contra 7,0% (total dos demais organismos e fatores químicos somados). Os agentes etiológicos mais frequentes são as bactérias *Salmonella* sp, com 42,5% dos casos, *Staphylococcus* sp., com 20,5%, e *Bacillus cereus* responsável por 7,0%.

A coleta nas cidades-sede dos jogos da Copa do Mundo de futebol 2014 visa avaliar as condições sanitárias na fabricação de alimentos artesanais, pois nestes

lugares espera-se um grande fluxo de turistas. A escolha de salame e queijos se deve ao fato de serem produtos de origem animal, prontos para consumo, nos quais há maior possibilidade de isolamento dos micro-organismos em questão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PATÓGENOS DE IMPORTÂNCIA EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

A maioria das doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil são causadas por *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., e *Bacillus cereus* (BRASIL, 2013).

Segundo a RDC 12 (BRASIL, 2001), a tolerância para amostra indicativa de salames é de 1×10^3 coliformes a 45°C/g , 5×10^3 estafilococos coagulase positiva/g e ausência de *Salmonella* sp/25g. A tolerância para amostra indicativa de queijos de muita alta umidade é de 5×10^2 coliformes a 45°C/g , 5×10^2 estafilococos coagulase positiva/g, ausência de *Salmonella* sp/25g e ausência de *L. monocytogenes*/25g.

2.1.1 *Escherichia coli* e coliformes totais

A WHO (*World Health Organization*, 2006) define coliformes totais como bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, capazes de crescer na presença de concentrações relativamente altas de sais biliares e capazes de fermentar a lactose entre 35°C a 37°C com produção de ácido, gás e

aldeído, dentro de 24h. Além da fermentação da lactose, coliformes totais produzem a enzima β -D-galactosidase.

Gêneros como *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* são tradicionalmente conhecidos como coliformes, mas o grupo inclui uma diversidade ainda maior, como *Serratia* e *Hafnia*. (WHO, 2006).

E. coli está incluída tanto no grupo de coliformes totais, quanto no dos coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais endotérmicos, embora possa ser introduzida nos alimentos através de fontes não fecais (SILVA *et al.*, 2010). É um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, que fermenta açúcares, com produção de ácidos e gases (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). É a espécie bacteriana mais comum do trato intestinal, assim como a mais comumente isolada em laboratórios clínicos e tem causado doenças infecciosas em praticamente todos os tecidos e sistemas orgânicos dos seres humanos. *E. coli* é uma das bactérias Gram-negativas mais comuns causadores da sepse no choque induzido por endotoxina. Sua presença em água e alimentos é um indicador de contaminação fecal (KONEMAN, 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Normalmente *E. coli* não é patogênica, contudo pode causar infecções do trato urinário. Certas linhagens produzem enterotoxinas que causam a diarreia do viajante e ocasionalmente causam várias doenças graves de origem alimentar. Entre os surtos alimentares o sorotipo mais conhecido é *E. coli* O 157:H7. Estima-se que esses surtos deixem mais de 60 mil pessoas doentes, como mais de 50 mortes por ano nos Estados Unidos causados por este sorotipo (KONEMAN, 2008).

2.1.2 *Staphylococcus* coagulase positiva

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos e catalase positivos. Estes micro-organismos ocorrem na forma de células isoladas, em pares, tétrades e cadeias curtas, porém aparecem predominantemente em grupos semelhantes a cachos de uva. Em geral, os estafilococos são encontrados na pele e nas mucosas de seres humanos e outros animais (KONEMAN, 2008).

Alguns dos estafilococos patogênicos produzem uma enzima denominada coagulase, cuja detecção é utilizada em laboratório para identificação destes micro-organismos (KONEMAN, 2008).

A espécie *Staphylococcus aureus* faz parte da microbiota normal de mucosas e pele e pode ser transmitida aos alimentos por contato direto ou indireto (através de fragmentos de pele e secreções do trato respiratório). Nos alimentos, podem se multiplicar e produzir enterotoxinas, a partir de contagens de *S. aureus* em torno de 10^6 UFC/g.

Algumas características dos estafilococos podem conferir vantagens e favorecer a patogenicidade deste gênero. Este grupo cresce bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade, o que, em parte, pode explicar porque sobrevivem nas secreções nasais e na pele. Isto explica também como *S. aureus* pode crescer em alimentos com alta pressão osmótica, como presuntos e outras carnes curtidas (KONEMAN, 2008). *S. aureus* é patogênico por produzir uma série de toxinas que debilitam o organismo e danificam tecidos. A habilidade esta espécie em desenvolver

rapidamente resistência aos antibióticos como penicilina, por exemplo, contribui para seu perigo no caso de pacientes em ambiente hospitalar (KONEMAN, 2008).

FDA/CFSAN, 2005 e ICMSF, 1996, *apud*, Silva, *et al.*, 2010, explicitam a gravidade no caso de intoxicação por *S. aureus* :

“A doença transmitida por *S. aureus* é uma intoxicação, provocada pela ingestão de toxinas formadas no alimento, quando ocorre a multiplicação das células. As toxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes à cocção e às enzimas proteolíticas. A ingestão de uma dose menor que 1 µg pode provocar os sintomas da intoxicação e essa quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* alcança valores acima de 10⁶ UFC/g de alimento”

Silva, *et al.* (2010) relatam que entre alimentos relacionados a surtos causados por *S. aureus* estão carnes e produtos cárneos (especialmente presuntos), aves, ovos, produtos lácteos e derivados (especialmente queijos), saladas mistas com vários ingredientes (ovos, atum, frango, batata), patês, molhos, macarrão, tortas de cremes, bombas de chocolate e sanduíches com recheios.

2.1.3 *Listeria* spp.

O gênero *Listeria* compreende bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, em forma de bastonetes regulares. Enquanto todas as espécies de *Listeria* podem ser isoladas do meio ambiente e de uma variedade de animais, tanto patógenos quanto comensais, apenas *Listeria monocytogenes* é um patógeno bem conhecido de animais, especialmente os domésticos (roedores, cavalos, coelhos, ovinos, ruminantes) e humanos. Os animais adquirem a infecção do meio

ambiente, onde o micro-organismo contamina vegetação e solo. As infecções nestes incluem sepse, tromboencefalite, prematuridade e aborto.

L. monocytogenes é um contaminante comum de produtos alimentícios. Tem a capacidade de crescer em biopelículas na superfície de diversos alimentos, e a refrigeração aumenta, na realidade, o crescimento destes micro-organismos, em virtude de sua capacidade de crescer a 4°C (KONEMAN, 2008). Características importantes da *L. monocytogenes* incluem sua capacidade de sobreviver dentro das células fagocíticas e de crescer em temperaturas de refrigeração (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Esta espécie pode contaminar alimentos, especialmente laticínios.

Pode ocorrer infecção sintomática aguda por esta bactéria durante a gravidez, habitualmente na segunda metade da gestação (segundo ou terceiro trimestre), e a doença manifesta-se com sintomas semelhantes à influenza, com febre, faringite, mialgia, mal-estar, dor na parte inferior do abdome e dor nas costas. A infecção, não sendo tratada, poderá provocar um aborto espontâneo, aumentar a probabilidade de o bebê sofrer de problemas respiratórios, meningite ou hipotermia, logo após o nascimento. A gestante pode, ainda, transmitir a infecção ao bebê (durante o parto) (KONEMAN, 2008).

2.1.4 *Salmonella* spp.

As bactérias *Salmonella* são bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos. Quase todas as espécies ou sorotipos deste gênero são potencialmente patogênicos. As salmonelas são habitantes comuns do trato

intestinal de vários animais, principalmente aves domésticas e bovinos. Em condições sanitárias precárias, elas podem contaminar alimentos. Produtos à base de carne são particularmente suscetíveis à contaminação por *Salmonella*. Estima-se que um ovo em cada 20 mil esteja contaminado por esta bactéria (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A salmonelose constitui uma importante causa de doença entérica bacteriana tanto em humanos como outros animais. A cada ano, estima-se que ocorram 1 milhão e 400 mil casos de salmonelose em seres humanos nos Estados Unidos, resultando em 16.000 hospitalizações e aproximadamente 600 mortes. Os laboratórios de saúde pública efetuam a sorotipagem de cerca de 35.000 desses casos, cujos resultados são eletronicamente transmitidos aos CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). As infecções humanas por salmonelas são mais comumente causadas pela ingestão de alimentos, água ou leite contaminados por fezes humanas ou de animais (KONEMAN, 2008).

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal verificar se queijos e salames comercializados em duas cidades-sede da copa do mundo de futebol de 2014, Curitiba e Porto Alegre, são próprios para consumo.

Objetivos específicos:

- Isolamento primário e identificação presuntiva de bactérias patogênicas em queijos e salames comercializados em duas cidades-sede da copa do mundo de futebol de 2014, Curitiba e Porto Alegre.
- Quantificação das UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, por grama, por tipo de alimento e localidade.
- Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp, por tipo de alimento e localidade.
- Comparação dos dados obtidos com a legislação aplicável, RDC 12/2001 da ANVISA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDO

Foram coletados seis amostras queijos e seis amostras de salames nas cidades de Porto Alegre e Curitiba entre fevereiro e abril de 2013. Cada amostra foi comprada de um estabelecimento comercial diferente.

4.2. COLETA, TRANSPORTE E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras continham um mínimo de 200g cada. Imediatamente após a compra os alimentos foram acondicionados em gelo e caixa de isopor hermeticamente fechada e encaminhados ao Laboratório de Controle de Qualidade da Laborclin – Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais, Paraná.

4.3. ISOLAMENTO PRIMÁRIO - ETAPA COMUM

Antes da abertura das embalagens, a área externa das embalagens foi desinfetada com álcool 70% para remoção dos contaminantes presentes. A abertura e

retirada das alíquotas foram realizadas em bancada com bico de Bunsen, no interior de sala com filtração de ar e pressão positiva (capela de fluxo laminar), para prevenir qualquer contaminação ambiental. No caso do salame foi removida a película que protege o mesmo (SILVA, *et al.*, 2010).

Os utensílios utilizados para fragmentar as amostras, como facas, garfos e placas de vidro, foram previamente embalados e autoclavados a 120 °C, 1 atm, por 20 min, assim como, secos em estufa a 45 °C até secar.

Uma alíquota de 25g de cada queijo e cada salame foi fracionada. Cortaram-se pequenas porções do alimento em várias regiões do mesmo.

O alimento fracionado foi acondicionado em cartucho plástico esterilizado e pesado em balança de precisão. Em seguida foi adicionado 225mL de água peptonada 0,1%, 1% ou Caldo Fraser conforme especificidades de cada micro-organismo isolado. O cartucho foi vedado com grampo próprio. Com movimentos entre a palma das mãos homogeneizou-se por sessenta segundos a mistura do alimento com a água peptonada. Esta mistura foi transferida para o frasco original da água peptonada e deu-se sequência às diluições seriadas (Figura 1).

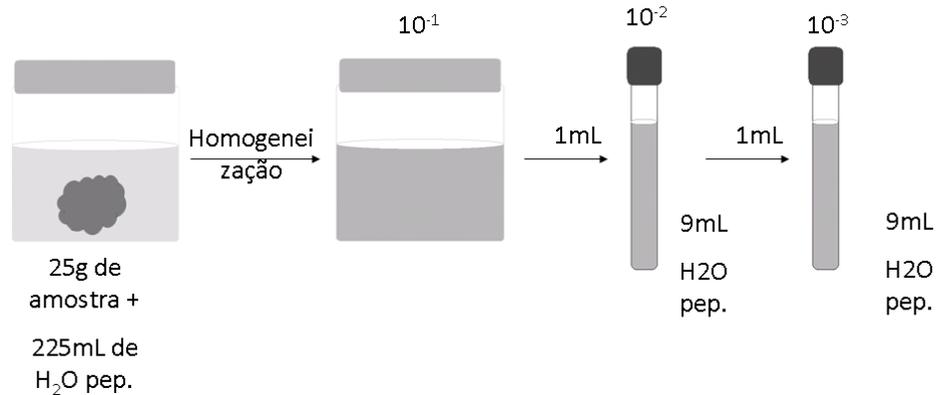


FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DO PREPARO DE AMOSTRA E DILUIÇÕES PARA CONTAGEM.
 FONTE: Manual de Análises Microbiológicas em Indústrias, LABORCLIN, 2012 (adaptado)

4.3.1 Isolamento de coliformes totais e *Escherichia coli*

O isolamento de coliformes totais e *E. coli* foi realizado semeando-se em superfície 0,1 mL da amostra diluída, com alça de Drigalski, em ágar ECC[®], conforme o fluxograma (Figura 2). As placas foram incubadas por 24±2 horas a 35±1°C. Colônias róseas são típicas de coliformes totais, colônias azul-claro e azul-escuro são típicas de *E. coli*. As colônias típicas foram repicadas em ágar Cromoclin US[®] para confirmação, no qual coliformes totais apresentam coloração azul, e *E. coli* rósea.

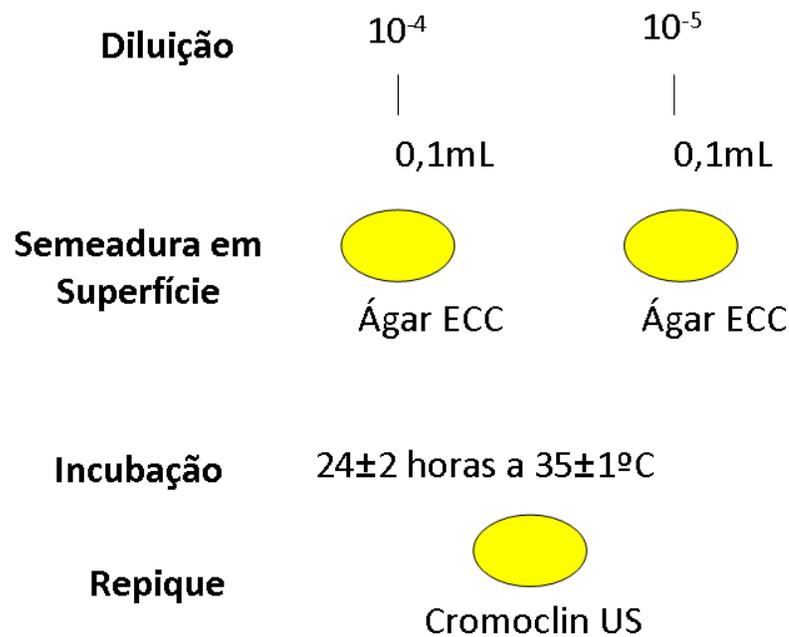


FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DE ISOLAMENTO E CONTAGEM DE COLIFORMES E *E. coli*.
 FONTE: Manual de Análises Microbiológicas em Indústrias, LABORCLIN, 2012 (adaptado)

4.3.2 Isolamento de *Staphylococcus coagulase positiva*

O isolamento de *Staphylococcus coagulase positiva* foi realizado semeando-se em superfície 0,1 mL da amostra diluída, com alça de Drigalski, em ágar ágar Baird Parker, conforme o fluxograma (Figura 3). As placas foram incubadas por 48±2 horas a 35±1°C. Em seguida foi realizado o teste de catalase das colônias típicas (cinzas ou negras, com ou sem halo iridescente ou transparente). Colônias catalase positiva foram repicadas em ágar Cromoclin US[®], e depois submetidas a testes de identificação bioquímica através do método de coagulase em lâmina, utilizando Staphclin[®] (Laborclin, Pinhais, Brasil).

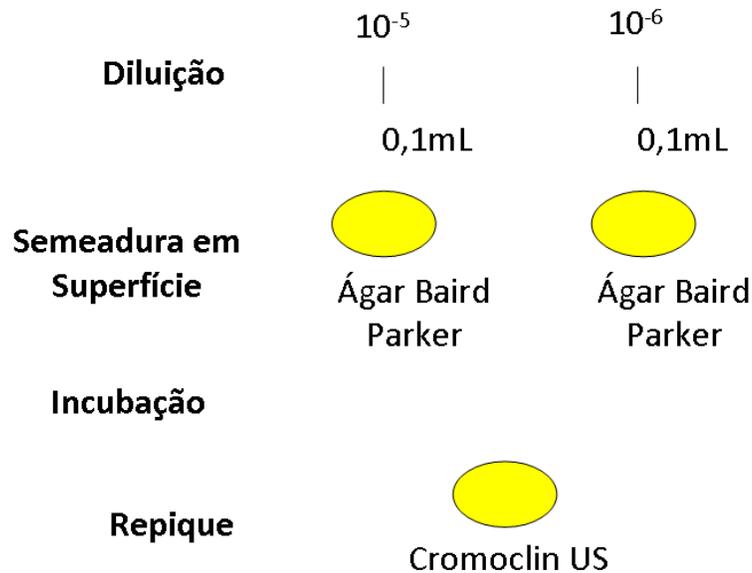


FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DE ISOLAMENTO E CONTAGEM DE *Staphylococcus* sp
 FONTE: Manual de Análises Microbiológicas em Indústrias, LABORCLIN, 2012 (adaptado).

4.4 ISOLAMENTO PRIMÁRIO DE *Listeria* spp.

Foram suspensos 25g do alimento em 225 mL de caldo Demi-fraser. Havendo suspeita de crescimento, isto é, enegrecimento do caldo após 24 horas de incubação a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, foi repicado uma alçada para caldo Fraser em tubo. Este foi incubado a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 ± 2 horas. Havendo suspeita de crescimento, (enegrecimento do caldo), foi repicada uma alçada para a superfície de ágar ALOA. Após 24 a 48h de crescimento em $35\pm 1^{\circ}\text{C}$, selecionaram-se as colônias típicas: azul claras, com ou sem halo transparente para o ágar ALOA, conforme fluxograma (Figura 4), (LABORCLIN, 2012).

Colônias típicas foram repicadas em ágar TSA YE e identificadas fenotipicamente através da coloração de Gram, teste de catalase e teste de motilidade a 25°C em ágar semissólido.

Bacilos Gram-positivos curtos, catalase positiva, móveis a 25°C, foram caracterizados como *Listeria* sp, e a identificação fenotípica das espécies de *Listeria* foi realizada através da reação de fermentação da xilose, fermentação da ramnose, reação hemolítica em Agar sangue e reação de Camp em Agar sangue.

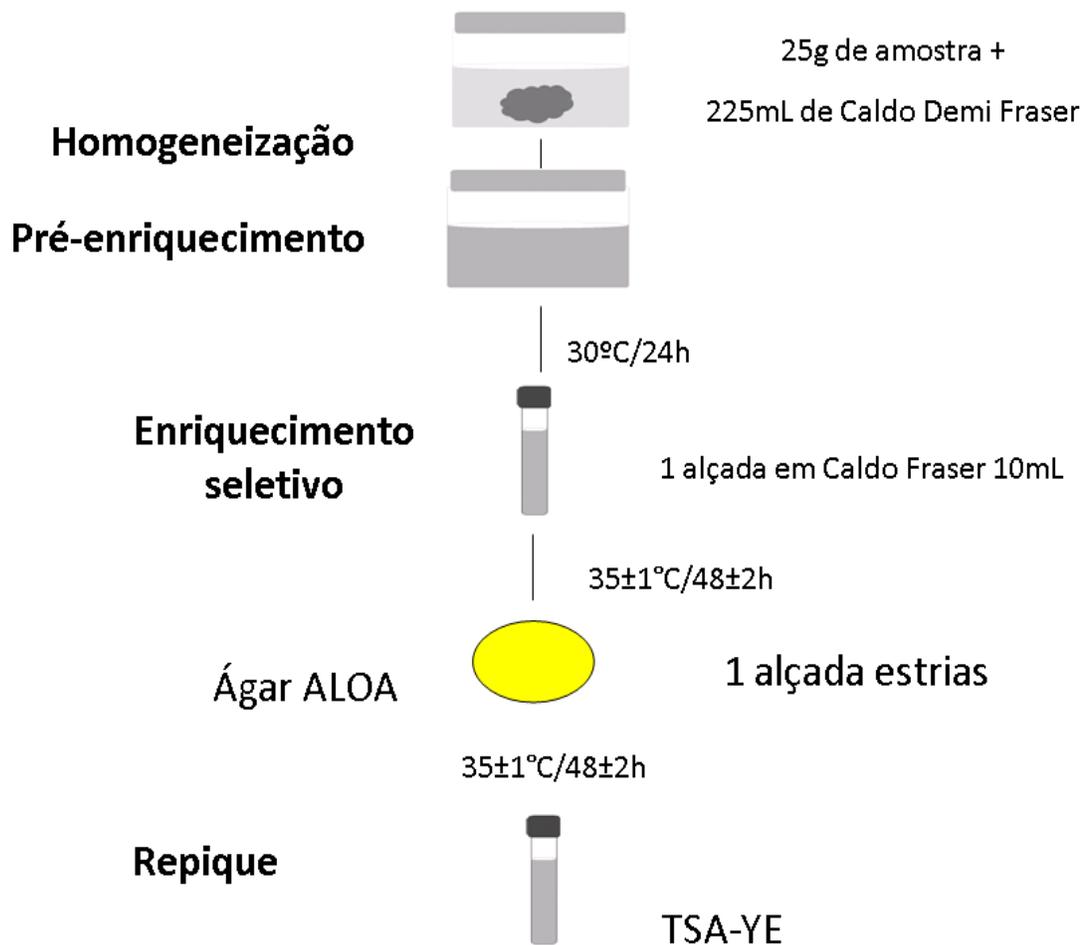


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA ISOLAMENTO DE *Listeria* spp.

FONTE: Manual de Análises Microbiológicas em Indústrias, LABORCLIN, 2012 (adaptado)

4.5 ISOLAMENTO PRIMÁRIO DE *Salmonella* spp.

Foram diluídos 25g do alimento em 225 mL de água peptonada tamponada 1%. Após 18 horas de incubação a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, foi repicado 0,1 mL da água peptonada para 10 mL do caldo Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) e 1,0 mL da água peptonada para 10 mL do caldo tetrionato Muller Kauffmann Novobiocina (MKTTn), acrescido de um disco de Novobiocina e 0,2 mL de lugol. Após 24 horas de incubação a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ respectivamente foi repicada 1 alçada na superfície da triplaca ágar XLD, verde brilhante e *Salmonella* cromogênico, da Laborclin[®]. As placas foram incubadas a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas, conforme o fluxograma apresentado na Figura 5 (LABORCLIN, 2012).

As colônias características de *Salmonella*, negras em ágar XLD, roxas no ágar *Salmonella* cromogênico foram repicadas em ágar nutriente e identificadas fenotipicamente através do sistema de identificação Bac tray[®] (Laborclin, Pinhais, Brasil).

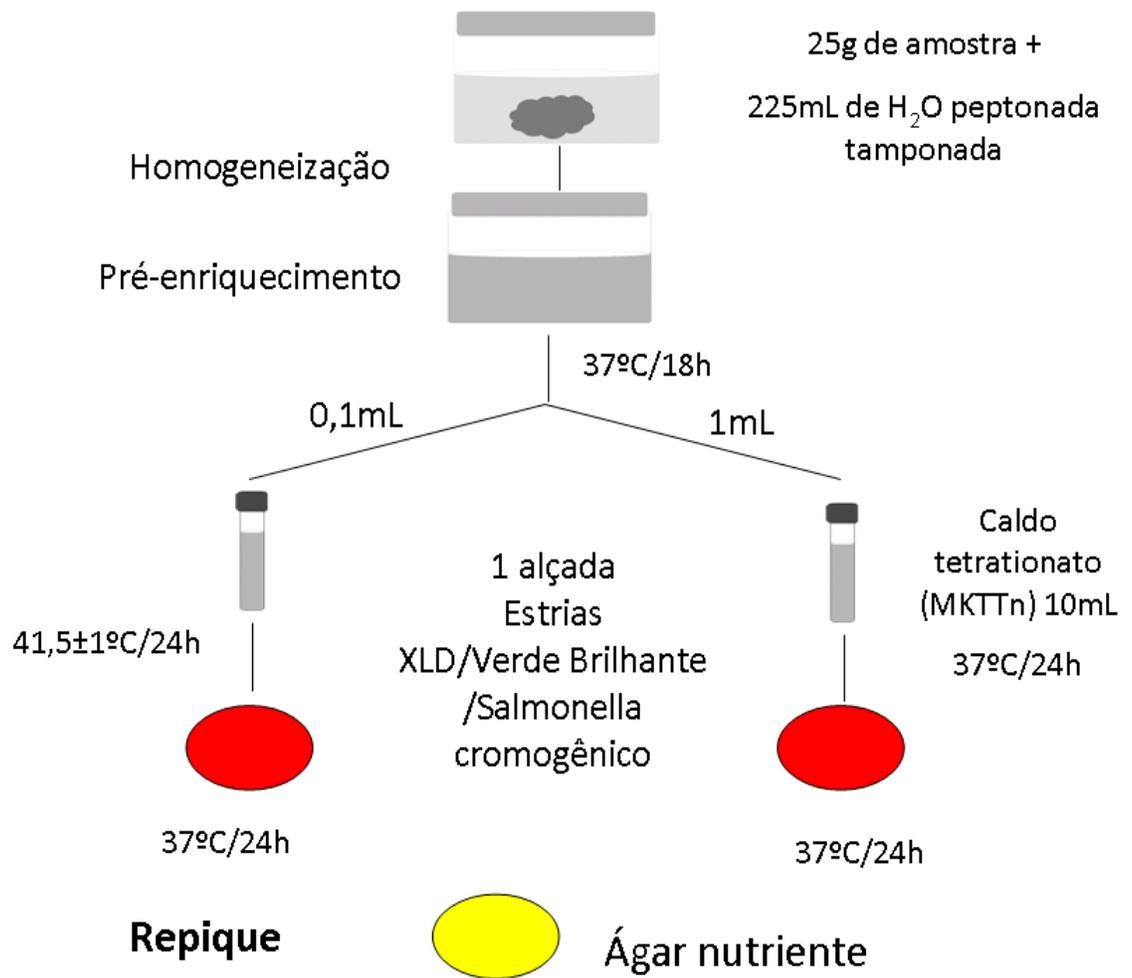


FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DO ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp.

FONTE: Manual de Análises Microbiológicas em Indústrias, LABORCLIN, 2012 (adaptado)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 1 a 5 e Gráficos 1 a 5 ilustram os resultados obtidos. Os valores estão expressos em logaritmo de base 10 para a contagem de UFC, por grama de alimento para quantificação de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva. Os valores de referência da RDC 12/2001 também foram transformados para logaritmo de base 10. O primeiro valor do eixo “y” é o valor-referência. Para *Listeria* spp. E *Salmonella* spp. Os resultados foram expressos em presença ou ausência em 25g de alimento.

5.1 QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS

Os coliformes totais foram isolados de duas amostras (33,3%) de salame com quantificação entre 4,60 a 4,91 \log_{10} UFC/g (Gráfico 1) e 5 amostras (83,3%) de queijos com quantificação entre 4,38 a 8,56 \log_{10} UFC/g (Gráfico 2). Não há parâmetros em legislação vigente (Tabela 1).

TABELA 1 - QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS/G DE AMOSTRAS DE SALAMES E QUEIJOS COMERCIALIZADOS NAS CIDADES DE PORTO ALEGRE E CURITIBA

Amostra	Cidade	Alimento	Coliformes totais
S01A	Porto Alegre	Salame	<2
S01B	Porto Alegre	Salame	<2
S01C	Porto Alegre	Salame	<2
Q01A	Porto Alegre	Queijo	<2
Q01B	Porto Alegre	Queijo	7,66
Q01C	Porto Alegre	Queijo	8,56
S02A	Curitiba	Salame	<2
S02B	Curitiba	Salame	4,91
S02C	Curitiba	Salame	4,60
Q02A	Curitiba	Queijo	5,32
Q02B	Curitiba	Queijo	7,08
Q02C	Curitiba	Queijo	4,38

Fonte: A autora (2013).

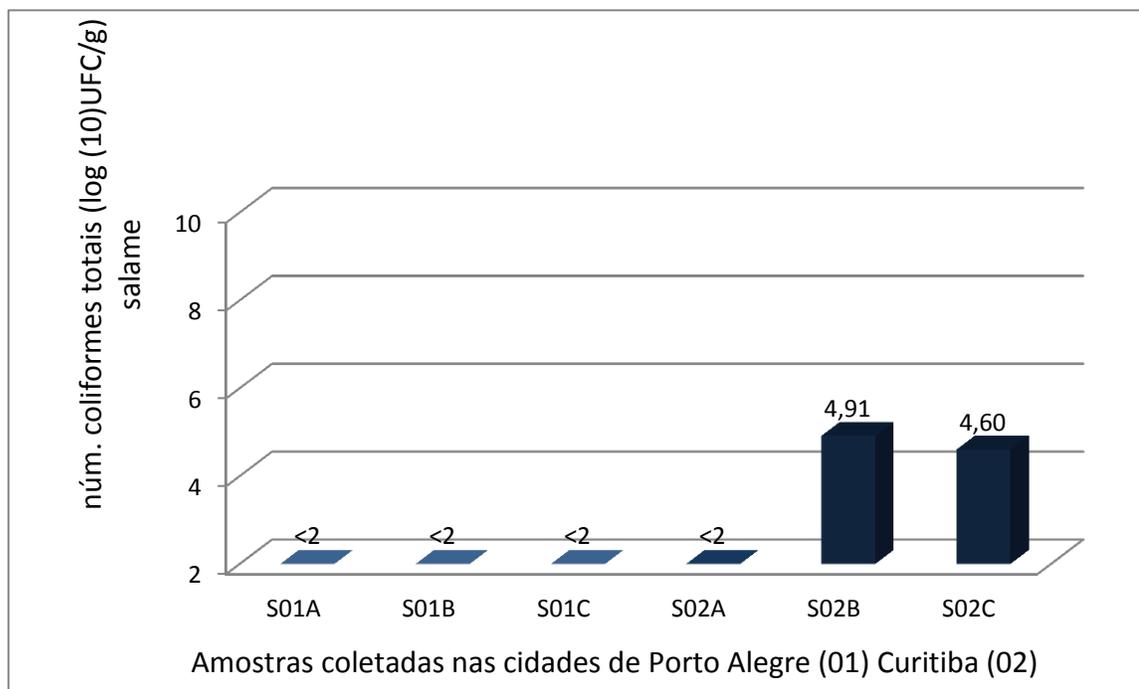


GRÁFICO 1 – QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS EM SALAMES.

Fonte: A autora (2013).

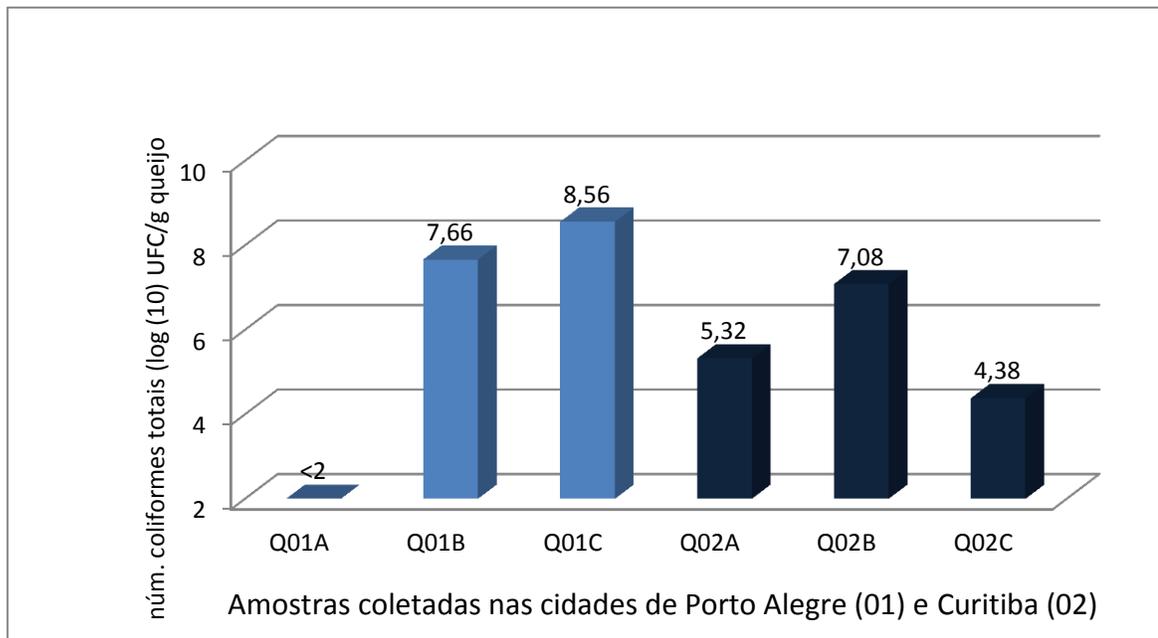


GRÁFICO 2 – QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TOTAIS EM QUEIJOS
Fonte: A autora (2013).

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE *E. coli*

E. coli não foi isolada de amostras de salames, no entanto foram isolados a partir de 4 amostras (66,7%) de queijos apresentando quantificação entre 2,48 a 6,30 log₁₀ UFC/g. Considerando a *E. coli* ser a principal representante de coliformes a 45°C, também conhecida como coliformes termotolerantes, a tolerância indicativa para este micro-organismo é de 2,7 log₁₀ UFC/g. Assim, 3 amostras de queijo (50%) estão com quantificação acima da permitida em legislação vigente (Tabela 2, Gráfico 3).

Borges *et al.* (2013), obtiveram contagens entre 5,97 e 7,28 log₁₀ UFC/g de coliformes termotolerantes em queijos Minas artesanais comercializados na feira livre na cidade de Catalão, sugerindo a necessidade de implantação de boas práticas de

fabricação nas unidades produtoras deste queijo pois a sua presença indica contaminação por matéria fecal.

TABELA 2 - QUANTIFICAÇÃO DE *E. coli*/G DE AMOSTRAS DE SALAMES E QUEIJOS COMERCIALIZADOS NAS CIDADES DE PORTO ALEGRE E CURITIBA

Amostra	Cidade	Alimento	<i>E. coli</i>
S01A	Porto Alegre	Salame	<2
S01B	Porto Alegre	Salame	<2
S01C	Porto Alegre	Salame	<2
Q01A	Porto Alegre	Queijo	<2
Q01B	Porto Alegre	Queijo	6,30
Q01C	Porto Alegre	Queijo	6,08
S02A	Curitiba	Salame	<2
S02B	Curitiba	Salame	<2
S02C	Curitiba	Salame	<2
Q02A	Curitiba	Queijo	2,48
Q02B	Curitiba	Queijo	<2
Q02C	Curitiba	Queijo	3,85

Fonte: A autora (2013).

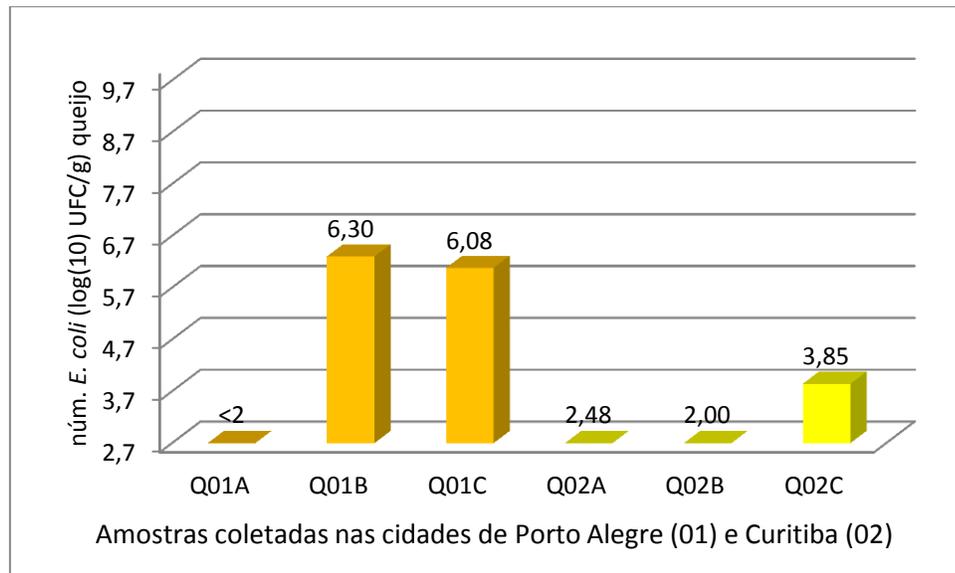


GRÁFICO 3 – QUANTIFICAÇÃO DE *E. coli* EM QUEIJOS

Fonte: A autora (2013).

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA

Foram isolados *Staphylococcus* coagulase positiva a partir de uma amostra de salame (16,7%) com quantificação de 6,0 log₁₀ UFC/g, e a partir de 2 amostras de queijos (33,3%), numa quantificação entre 3,95 a 5,59 log₁₀ UFC/g, estando todos acima da tolerância permitida em legislação vigente, que é de 3,7 log₁₀ UFC de *Staphylococcus* coagulase positiva/g de salame e de 2,7 log₁₀ UFC de *Staphylococcus* coagulase positiva/g de queijos de muita alta umidade (Tabela 3, Gráficos 4 e 5).

Os dados obtidos corroboram os de Afra *et al.* (2013), os quais constataram que 33,3% de queijo coalho comercializados nas praias do estado de Alagoas estão com contagens superiores às previstas em legislação, indicando falha no processamento térmico, oferecendo risco de toxinfecções à população que consome o queijo nas praias.

TABELA 3 - QUANTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA/G DE AMOSTRAS DE SALAMES E QUEIJOS COMERCIALIZADOS NAS CIDADES DE PORTO ALEGRE E CURITIBA

Amostra	Cidade	Alimento	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
S01A	Porto Alegre	Salame	<2
S01B	Porto Alegre	Salame	<2
S01C	Porto Alegre	Salame	<2
Q01A	Porto Alegre	Queijo	<2
Q01B	Porto Alegre	Queijo	<2
Q01C	Porto Alegre	Queijo	<2
S02A	Curitiba	Salame	<2
S02B	Curitiba	Salame	6,00
S02C	Curitiba	Salame	<2
Q02A	Curitiba	Queijo	<2
Q02B	Curitiba	Queijo	5,59
Q02C	Curitiba	Queijo	3,95

Fonte: A autora (2013).

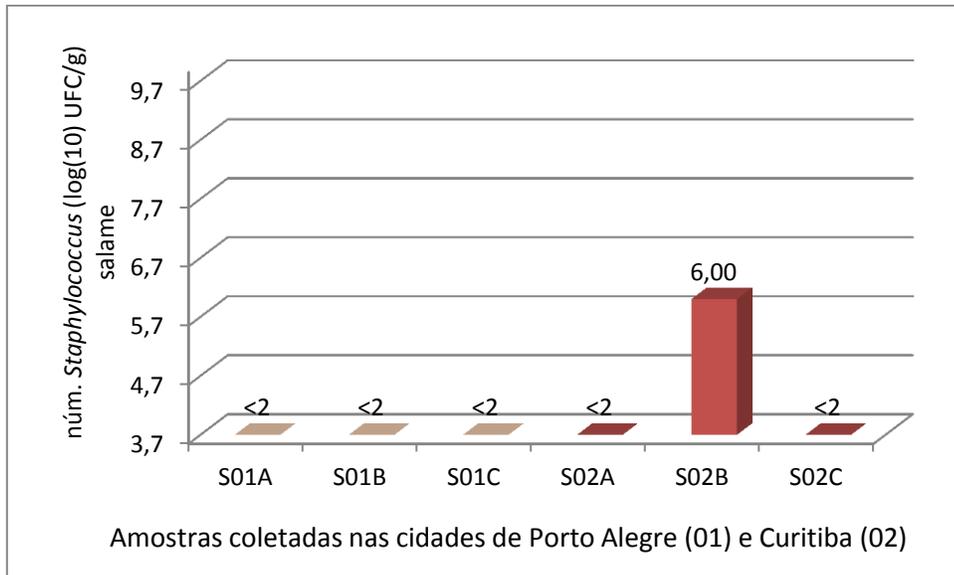


GRÁFICO 4 – QUANTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM SALAMES
 Fonte: A autora (2013).

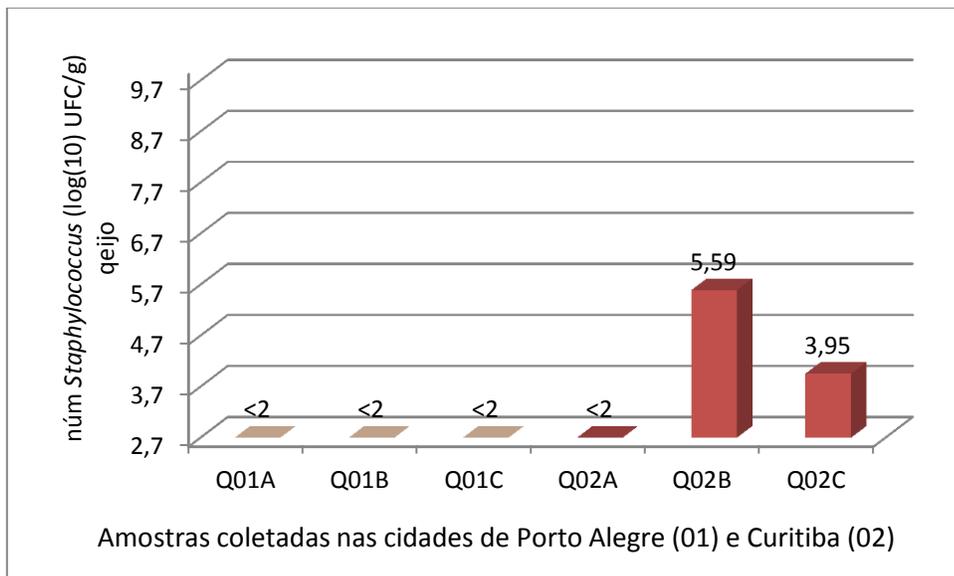


GRÁFICO 5 – QUANTIFICAÇÃO DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM QUEIJOS
 Fonte: A autora (2013).

5.4 PESQUISA DE PRESENÇA DE *Listeria* spp.

Foram isolados *Listeria* sp A partir de 1 amostra (16,7%) de queijos, e 3 amostras (50,0%) de salames, no entanto não houve recuperação de *L. monocytogenes* nas amostras analisadas (Tabela 4).

A presença de microbiota competitiva como *E. coli* pode inibir o crescimento de *Listeria* (SILVA *et al.*, 2013).

TABELA 4 - PESQUISA DE *Listeria* spp. EM 25 G DE AMOSTRAS DE SALAMES E QUEIJOS COMERCIALIZADOS NAS CIDADES DE PORTO ALEGRE E CURITIBA

Amostra	Cidade	Alimento	<i>Listeria</i> spp.
S01A	Porto Alegre	Salame	Ausência
S01B	Porto Alegre	Salame	Ausência
S01C	Porto Alegre	Salame	Ausência
Q01A	Porto Alegre	Queijo	Ausência
Q01B	Porto Alegre	Queijo	Presença
Q01C	Porto Alegre	Queijo	Ausência
S02A	Curitiba	Salame	Presença
S02B	Curitiba	Salame	Presença
S02C	Curitiba	Salame	Presença
Q02A	Curitiba	Queijo	Ausência
Q02B	Curitiba	Queijo	Ausência
Q02C	Curitiba	Queijo	Ausência

FONTE: A autora (2013).

5.5 PESQUISA DE PRESENÇA DE *Salmonella* spp.

Foram isoladas *Salmonella* sp A partir de uma amostra (16,7%) de salame (Tabela 5).

Do total de 286 surtos analisados no estado do Paraná, entre 1999 e 2008, 1% foi motivado pelo queijo e 34,8% por carnes e derivados. Cerca de 49,7% estiveram

associados a reuniões familiares, sugerindo que as ações da Vigilância Sanitária devem assumir um caráter educativo, tanto para trabalhadores de estabelecimentos comerciais quanto para manipuladores domésticos (KOTTWITZ *et al.*, 2010).

TABELA 5 - PESQUISA DE *Salmonella* spp. EM 25 G DE AMOSTRAS DE SALAMES E QUEIJOS COMERCIALIZADOS NAS CIDADES DE PORTO ALEGRE E CURITIBA

Amostra	Cidade	Alimento	<i>Salmonella</i> spp.
S01A	Porto Alegre	Salame	Ausência
S01B	Porto Alegre	Salame	Ausência
S01C	Porto Alegre	Salame	Ausência
Q01A	Porto Alegre	Queijo	Ausência
Q01B	Porto Alegre	Queijo	Ausência
Q01C	Porto Alegre	Queijo	Ausência
S02A	Curitiba	Salame	Ausência
S02B	Curitiba	Salame	Presença
S02C	Curitiba	Salame	Ausência
Q02A	Curitiba	Queijo	Ausência
Q02B	Curitiba	Queijo	Ausência
Q02C	Curitiba	Queijo	Ausência

Fonte: A autora (2013).

6 CONCLUSÃO

- Aproximadamente 66,7% dos queijos (quatro amostras, do total de seis) e 16,7% de salames analisados (uma amostra, do total de seis), produzidos artesanalmente nas regiões metropolitanas de Porto Alegre e Curitiba, apresentaram-se impróprios para consumo humano, de acordo com a resolução RDC 12 (BRASIL, 2001).
- Coliformes totais foram isolados de 83,3 % dos queijos e 33,33% dos salames, sendo de duas amostras de salames provenientes de Curitiba e, de duas amostras de queijos de Porto Alegre e de três amostras de queijos de Curitiba; embora não exista uma legislação vigente para estes micro-organismos nos alimentos avaliados, foram realizados estes testes para fins de comparação.
- *E. coli* foram isolados apenas de amostras de queijo, de quatro amostras, sendo duas de Porto Alegre e duas de Curitiba. Das quatro amostras positivas, três apresentaram contagens superiores à permitida pela RDC 12.
- *Staphylococcus coagulase positiva* foram isolados de uma amostra de salame e duas de queijos, apenas em Curitiba, com contagens acima da tolerada pela RDC 12.

- *Listeria* sp foram isolados de uma amostra de queijo de Porto Alegre e das três amostras de salames de Curitiba, entretanto a presença de *L. monocytogenes* não foi confirmada.
- *Salmonella* sp foram isoladas de uma amostra de salame proveniente de Curitiba.
- Os alimentos analisados apresentam contaminações por potenciais patógenos humanos, levando à necessidade de se estabelecer critérios mais rígidos na produção e comercialização destes produtos.

REFERÊNCIAS

- AFRA, J.F.; NETO, F.B.S.; LIMA, E.O.; XIMENES, G.N.C.; VEIGA, R.R.; SOARES, K.D.A.; MEDEIROS, E.S.; LIVERA, A.V. **Pesquisa de *Staphylococcus coagulase* positiva em amostras de queijos coalho comercializados nas praias do estado de Alagoas**. In Congresso Brasileiro de Microbiologia, 27. Natal, RN, 2013.
- BORGES, L.M.; ASSUNÇÃO, D.E.D.S.; SANTOS, A.L.; BARROS, J.J.C. **Enumeração de coliformes termotolerantes em queijo Minas artesanal comercializado em feira livre na cidade de Catalão – GO**. In Congresso Brasileiro de Microbiologia, 27. Natal, RN, 2013.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 – 2009**. Acesso em 15/03/13. Disponível em <[33TTP://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf)> f>
- BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. RDC 12. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. 02 de janeiro de 2001.
- KONEMAN, *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Trad. Eiler Fritsch Toros, *et al.*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOGER, I.; FARAH, S. M. S. S.; ABRAHÃO, W. S. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.
- LABORCLIN, **Manual de análises microbiológicas em indústrias**, Pinhais: Laborclin, 2012.
- MATIAS, M. Os efeitos dos megaeventos esportivos nas cidades. **Turismo & Sociedade**. Curitiba, v. 1, n. 2, p. 175-198, outubro de 2008.

SEBRAE. REVISTA PEQUENAS EMPRESAS GRANDES NEGÓCIOS. Acesso em 08 de março de 2013. Disponível em <<http://revistapegn.globo.com/Revista/Common/0,,EMI310324-17180,00-TAPIOQUEIRAS+SE+PREPARAM+PARA+A+COPA+DO+MUNDO.html>>

SILVA, D.H.L.; MAGALHÃES, A.S.; FILHO, O.M.P.; BIRUEL, V.B.C.; MORELLI, S.A.; SANTOS, R.F.S. **Prevalência de *Listeria monocytogenes* e *E. coli* em queijo Minas frescal e ricota comercializados na cidade de Campinas – SP.** In Congresso Brasileiro de Microbiologia, 27. Natal, RN, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água.** 4ª ed. São Paulo: Editora Varela, 2010.

ROQUE, A.; CARVALHO, P. Eventos desportivos e turismo em contexto urbano: o caso do Downhill. **Turismo & Sociedade.** Curitiba, v. 5, n. 2, p. 545-562, outubro de 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** MARTINS, R. M. (trad. atual.). 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality.** First addendum to third edition. v. 1. Recommendations. 3. ed. 2006.