

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM HIGIENE VETERINÁRIA E

PROCESSAMENTO TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM

ANIMAL

BRUNO REIS CARNEIRO DA COSTA
LIMA

AVALIAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE LINGUIÇA FRESCAL SUÍNA
ORIUNDAS DE MERCADOS DO MUNICÍPIO DE NITERÓI-RJ-BRASIL

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

NITERÓI

2011

BRUNO REIS CARNEIRO DA COSTA LIMA

Avaliação higiênico-sanitária de linguiça frescal suína oriundas de mercados do município de Niterói-RJ-Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

Orientador: Prof. Dr. ELMIRO ROSENDO DO NASCIMENTO
Co-orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

Niterói
2011

BRUNO REIS CARNEIRO DA COSTA LIMA

Avaliação higiênico-sanitária de linguiça fresca suína oriundas de mercados do município de Niterói-RJ-Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de P.O.A.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento – Orientador
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Robson Maia Franco – Co-orientador
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dra. Karen Signori Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Niterói
2011

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo suporte e educação fornecida durante toda minha vida. A minha mãe por ter me ensinado disciplina na educação desde a época do ensino fundamental. Ao meu pai por ter me ensinado bons valores do ser humano. Ao meu irmão por ser um amigo com quem já junto 25 anos de aprendizado. A meus avós por terem me apoiado desde quando criança.

Ao Prof. Elmiro Rosendo do Nascimento, pelas sugestões, auxílios prestados e calma transferida durante o curso.

Ao Prof. Robson Maia Franco, pela grande ajuda e confiança depositados nos períodos dentro do laboratório e em sala de aula.

Aos meus colegas de pós-graduação Alexandre Borges, Anna Carolina Canto, Bruna Rosa, César Lázaro, Érica Santos, Laís Buriti, Lúcia Rosa, Maria Lúcia Guerra, Rafael Nascimento, pela grande ajuda prestada não apenas na parte prática do trabalho, mas também na elaboração e análise dos resultados e nos momentos de descontração.

Ao Dr. José Carlos Albuquerque do Prado Carvalho e Alcinez Paes Fidelis pela ajuda prestada dentro do laboratório, sempre com rapidez e proatividade.

Aos colegas Cláudio Teixeira, Felipe Salgado, Francys Vasconcellos e Renan Soares pela amizade construída desde a graduação que perdura até o presente momento.

Às colegas Alessandra Lacaz, Camila Longa, Claudia Del Castilho, Elida e Ellen Santos, Thalita Vetori pelo convívio prazeroso durante o curso de pós-graduação.

Ao secretário Dráusio de Paiva Ferreira pela atenção e agilidade prestadas às solicitações.

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo apoio financeira, sem o qual não seria possível a realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

- 1 INTRODUÇÃO**,p. 13
- 2 OBJETIVOS**,p. 16
 - 2.1 OBJETIVO GERAL,p. 16
 - 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS,p. 16
- 3 REVISÃO DE LITERATURA**,p. 17
 - 3.1 HISTÓRICO DA LINGUIÇA,p. 17
 - 3.2 PRODUTOS FRESCAIS,p. 18
 - 3.3 ASPECTOS BACTERIANOS DE PRODUTOS CÁRNEOS,p. **¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.**
 - 3.4 *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA,p. 22
 - 3.5 COLIFORMES FECAIS,p. 23
 - 3.6 *Salmonella* spp.,p. 24
- 4 MATERIAL E MÉTODOS**,p. 26
 - 4.1 AMOSTRAS,p. 26
 - 4.2 ELABORAÇÃO E REALIZAÇÃO DA LISTA DE VERIFICAÇÃO,p. 27
 - 4.3 ELEIÇÃO DA MARCA A SER ANALISADA,p. 28
 - 4.4 MEDIÇÃO DA TEMPERATURA,p. 28
 - 4.5 ANÁLISE BACTERIOLÓGICA,p. 28

- 4.5.1 **Preparo das amostras e alíquotas**,p. 28
- 4.5.2 **Contagem e identificação de *Staphylococcus coagulase positiva***,p. 29
- 4.5.3 **Contagem de coliformes termotolerantes ou fecais**,p. 32
- 4.5.4 **Pesquisa de *Salmonella spp.*** ,p. 34
- 4.5.5 **Determinação e cálculo dos resultados**,p. 37
- 4.5.6 **Análise estatística**,p. 38

- 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**,p. 39
 - 5.1 LISTA DE VERIFICAÇÃO,p. 39
 - 5.2 MARCAS COMERCIAIS,p. 42
 - 5.3 TEMPERATURA,p. 42
 - 5.4 CONTAGEM DE BACTERIOLÓGICA,p. 45
 - 5.4.1 ***Staphylococcus coagulase positiva***,p. 46
 - 5.4.2 **Coliforme Fecal**,p. 49
 - 5.4.3 **Confronto superficial com interior**,p. 51
 - 5.4.4 **Pesquisa de *Salmonella spp.*** ,p. 57

- 6 CONCLUSÕES**,p. 60

- 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**,p. 61

- 8 APÊNDICE**,p. 68
 - 8.1 LISTA DE VERIFICAÇÃO,p. 69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Crescimento característico para *Staphylococcus* spp. em ágar Baird-Parker em diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , p.30
- Figura 2 Crescimento característico de *Staphylococcus* spp. em ágar Baird-Parker. A seta larga aponta um padrão típico (pretas com halo de lise), a seta delgada, padrão atípico (pretas ou acinzentadas sem halo de lise), p.30
- Figura 3 Coloração segundo Gram- visualização de cocos fortemente corados por cristal violeta em cacho, sugestivo de *Staphylococcus* spp, p.31
- Figura 4 Prova da catalase, a esquerda resultado positivo com borbulhas; a direita, negativo, p.31
- Figura 5 Prova da coagulase, a esquerda um tubo onde houve coagulação total da suspensão; e a direita, coagulação em menor intensidade, p.32
- Figura 6 Crescimento sugestivo de coliformes em ágar VRBA. Os números -1, -2 e -3 correspondem às diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), p.33
- Figura 7 Tubo com meio EC com comportamento característico para coliformes fecais (presença de gás no interior do tubo de Durham, delimitado pelo círculo), p.34
- Figura 8 Comportamento sugestivo de *Salmonella* spp nos meios de plaqueamento seletivo BPLS, Hektoen e McConkey lactose (da esquerda para direita), p.35
- Figura 9 Cultivos em ágar TSI com comportamento sugestivo para *Salmonella* spp.: (A) sem formação de H_2S ou produção de gás; (B) sem H_2S e com produção de gás, (C)(D)(E)(F) diferentes graduações de formação de H_2S e sem produção de gás, p.36

Figura 10 Prova de soloaglutinação, a esquerda está resultado negativo e na direita, positivo, p.37

Figura 11 Disposição dos percentuais de não conformidade no grupos de itens observados da Lista de Verificação aplicada nos mercados dos grupos A, B e C, p.40

Figura 12 Disposição em gráfico de média e desvio padrão de temperatura dos diferentes mercados. A linha tracejada representa o limite máximo sugerido pelo fabricante para amostras refrigeradas(4°C) , p.44

Figura 13 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva na superfície das amostras, p.48

Figura 14 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva no interior das amostras. A linha tracejada representa o limite máximo permitido para amostra indicativa(5×10^3 UFC/g) , p.48

Figura 15 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de coliforme fecal na superfície das amostras, p.50

Figura 16 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de coliforme fecal no interior das amostras. A linha tracejada representa o limite máximo permitido para amostra indicativa (5×10^3 UFC/g) , p.50

Figura 17 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva no interior e superfície das amostras. As amostras que contém a letra s representam as superficiais. A linha tracejada representa o limite máximo permitido para amostra indicativa(5×10^3 UFC/g) , p.53

Figura 18 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de coliforme termotolerante no interior e superfície das amostras. As amostras que contém a letra s representam as superficiais. A linha tracejada representa o limite máximo permitido para amostra indicativa(5×10^3 UFC/g) , p.54

Figura 19 Disposição da prevalência de *Salmonella* spp. nas alíquotas superficial e interna de amostra de linguiça frescal suína, p.57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

- Tabela 1 Disposição das temperaturas internas no momento de coleta e seus percentuais dentro de cada grupo, p.42
- Tabela 2 Disposição de média e desvio padrão de temperatura dos diferentes mercados($p < 0,05$) , p.43
- Tabela 3 Disposição de médias em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva. Os dados devem ser analisados em coluna, uma vez que as unidades das contagens das unidades formadoras de colônias de superfície e interior são diferentes entre si(UFC/cm² e UFC/g). Valores acompanhados de letras diferentes são estatisticamente distintos($p < 0,05$), p.47
- Tabela 4 Disposição de médias em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de coliforme fecal. Os dados devem ser analisados em coluna, uma vez que a unidade das contagens de superfície e interior são diferentes entre si(UFC/cm² e UFC/g). Valores acompanhados de letras diferentes são estatisticamente distintos($p < 0,05$) , p.49
- Tabela 5 Disposição dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliforme fecal no interior e superfície das amostras, p.52
- Quadro 1 Valores mínimos de temperatura, pH e atividade de água preditos onde $p < 0,01$ para *Staphylococcus aureus*(VALERO et al., 2009) , p.55
- Tabela 6 Disposição dos percentuais de confirmação sorológica a partir de comportamento característico para gênero *Salmonella* em ágar “Triple Sugar Iron”, p.58
- Tabela 7 Disposição dos pontos de não conformidade e seus percentuais com relação ao total observado em cada grupo, p.70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C.- antes de Cristo
ANOVA-Análise de Variância
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APT- Água Peptonada Tamponada
B- ágar Bismuto Peptona Lactose Sacarose
BHI- “Brain Heart Infusion”
BPF- Boas Práticas de Fabricação
BPLS-ágar Bismuto Peptona Lactose Sacarose
C-Conforme
cm- centímetros
CO₂ dióxido de carbono
DAEC- Escherichia coli de agregação difusa
EAEC- Escherichia coli enteroagregativa
EC- caldo Escherichia coli
EHEC- Escherichia coli enterohemorrágica
EIEC- Escherichia coli enteroinvasora
EPEC- Escherichia coli enteropatogênica
EPS- exotoxinas pirogênicas streptococcica
ES- estafiloenterotoxinas
ETEC- Escherichia coli enterotoxigênica
g- gramas
H- ágar Hektoen
h- horas
H₂S- ácido sulfídrico, gás sulfídrico
K- potássio
MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento
Mc- ágar McConckey lactose
mL-mililitros
NA- Não Aplicável
NC- Não Conforme
NMP- Número Mais Provável
°C- graus Celsius
pH- potencial hidrogeniônico
PPHO- Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
PSO- Procedimentos Sanitários Operacionais

RDC- Resolução da Diretoria Colegiada
RV- Rapaport-Vassiliadis
SC- Selenito Cistina
TSCT- toxinas da síndrome do choque tóxico
TSI- ágar "Triple Sugar Iron"
UFC/cm²-Unidades Formadoras de Colônia por cm²
UFC/g- Unidades Formadoras de Colônia por grama
VRBA- "Violet Red Bile agar"

RESUMO

A população brasileira diariamente consome produtos cárneos frescos, como linguiças e carne moída, seja pelo seu baixo custo ou pelas suas características sensoriais muito apreciadas. A elaboração destes produtos é singular devido a não utilização de processamentos tecnológicos, sendo o frio o principal processo de conservação. Desde o início da industrialização, até o prato do consumidor final, a cadeia de frio e a condição higiênico-sanitária do meio e dos manipuladores são os principais pontos críticos de controle. O presente trabalho objetivou avaliar a qualidade microbiológica de linguiças frescas por meio da análise de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, e *Salmonella* spp.; além de aferir a temperatura do interior das amostras no momento de coleta. Adicionalmente a pesquisa consistiu, na avaliação higiênico-sanitária de estabelecimentos comerciais do município de Niterói e seu agrupamento em graus de qualidade. Foram selecionados aleatoriamente mercados de cada classe (3 de A, 5 de B e 4 de C) de onde foram coletadas 93 amostras de linguiça fresca de pernil suíno, no total, durante oito meses, para avaliação bacteriológica na superfície e no interior do produto. Todos os mercados apresentaram padrão semelhante quanto aos itens de não conformidade sendo a renovação de ar e a higienização das mãos os mais frequentemente observados. Quanto à temperatura, 66% das aferições estavam fora do padrão, tendo como média $5,2(\pm 4,5)^{\circ}\text{C}$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre superfície e interior nas contagens nos diferentes mercados ($p > 0,05$). As classes de mercado (A, B e C) obtiveram as seguintes médias para *Staphylococcus* e coliformes respectivamente: $1,41(\pm 1,13)$; $1,58(\pm 1,25)$; $2,16(\pm 1,25)$ e $0,00(\pm 0,00)$; $0,40(\pm 0,69)$; $0,29(\pm 0,69)$; para superfície (UFC/cm²) e $2,10(\pm 1,51)$; $1,74(\pm 1,43)$; $2,32(\pm 1,56)$ e $1,07(\pm 1,33)$; $0,88(\pm 1,22)$; $0,98(\pm 1,25)$; para o interior (UFC/g). Todas as médias estavam de acordo com tal padrão microbiológico. Diferentemente *Salmonella* estava presente em 53% das amostras: oito (9%) apresentaram o agente em ambas as porções, dez (11%) apenas na face externa e 30 (33%) apenas no interior. Estes resultados caracterizam a não conformidade deste produto em diversos momentos de análise e possível risco para saúde humana.

Palavras-chave: Linguiça fresca suína, Temperatura, *Staphylococcus aureus*, Alimento seguro, *Salmonella* spp., Coliformes fecais

ABSTRACT

Brazilian people consumes daily fresh meat product as sausages or minced beef, as because of it's low cost or for the high sensory characteristic. The manufactory of those products are singular because the lack of technological process that guarantee the safety, being the cold the only and exclusive conservation procedure. From the beginning of the industrialization, to the final costumer plate, the cold chain, the hygienic and sanitary condition of the manipulator and the surrounding are the main critical control points. This work aimed the evaluation of microbiological quality of fresh pork sausages through analyses of thermotolerant coliforms, *Staphylococcus* positive coagulase and *Salmonella* spp, besides inner temperature taking of the samples. Additionally the assay consisted on the hygienic and sanitary evaluation of retail establishments from Niterói district rating them with quality scores. There were randomly selected establishments from each range(three from A, six from B and four from C) from which were collected 93 samples of fresh pork leg sausage in total, during eight months, to the bacteriological evaluation on the surface and inside. All markets showed similar points regard the check list as the air renewal and the hand hygienization were the most observed. About the temperature, 66% of the takings showed no compliance having as average $5,2(\pm 4,5)^{\circ}\text{C}$. There wasn't significantly statistic difference between surface and interior on the values from different establishments ($p > 0,05$). The rates grade(A,B and C) had the following averages of *Staphylococcus* and coliforms: $1,41(\pm 1,13)$; $1,58(\pm 1,25)$; $2,16(\pm 1,25)$ e $0,00(\pm 0,00)$; $0,40(\pm 0,69)$; $0,29(\pm 0,69)$; to the surface and $2,10(\pm 1,51)$; $1,74(\pm 1,43)$; $2,32(\pm 1,56)$ e $1,07(\pm 1,33)$; $0,88(\pm 1,22)$; $0,98(\pm 1,25)$; to the inside. All the averages were at compliance with the bacteriological standard. *Salmonella* were present in 53% of the samples, which: 8(9%) present on both portions, 10(11%) only at the outer face and 30(33%) at the inside. Those results point the no compliance of this product at several moments of the study and its possible risk to human health.

Key-words: Fresh pork sausage, Temperature, *Staphylococcus aureus*, Safe food, *Salmonella* spp., Fecal coliform

1 INTRODUÇÃO

Os produtos cárneos estão presentes diariamente na alimentação da população brasileira, culturalmente as duas grandes refeições do dia devem envolver porções de carne ou derivados. O Brasil se tornou um grande produtor e exportador de carne bovina, suína e de aves, com isso o consumidor brasileiro pode desfrutar de maior variedade de industrializados. Os produtos frescos, seja pelo seu baixo custo ou pelo seu apelo sensorial, são importantes fontes de proteína para grande parte da população. Sua grande preferência é exemplificada no costumeiro churrasco, prática interessante onde dificilmente é controlada a temperatura de cozimento no centro geométrico das porções cárneas. O subprocessamento térmico neste caso permite a sobrevivência e/ou multiplicação de patógenos que ao serem ingeridos poderão causar enfermidades.

Agentes etiológicos das doenças alimentícias são relatados pela literatura em diversas eras do desenvolvimento humano. Os agravos não se restringem apenas à enfermidade de poucos indivíduos, mas também invadem barreiras internacionais, desestabilizam acordos comerciais e geram prejuízos à Saúde Coletiva. Diversos fatores estão envolvidos com a contaminação, propagação e desenvolvimento de patógenos nos alimentos. Estão bem elucidadas as diferentes fontes de contaminação e propagação podendo ser agrupadas em matéria-prima, utensílios/equipamentos e manipuladores; cada um com suas respectivas singularidades.

Na esfera microbiana, importantes fatores como binômio tempo x temperatura, pH, atividade de água, umidade, potencial de oxidação, teor de proteína, gordura, carboidratos, orquestram a adaptação e desenvolvimento dos diversos gêneros nos produtos. A tecnologia de alimentos, tendo como um de seus objetivos, a qualidade higiênico-sanitária, procura justamente interferir no crescimento destes agentes.

Os produtos cárneos são considerados meios propícios para o desenvolvimento microbiano devido a suas características físico-químicas. Logo, diversas tecnologias foram desenvolvidas com intuito de reduzir, controlar e debelar a presença e o crescimento da microbiota deteriorante e patogênica.

No caso de linguiça frescal, não há método físico de redução da carga bacteriana a não ser a manutenção sob refrigeração. Desde o período de recria dos animais na fazenda, passando pela industrialização nos frigoríficos e no comércio, até a manipulação em casa pelo consumidor final, diversos pontos críticos podem ser detectados. Por isso, este produto possui uma validade comercial muito curta, o que pode representar risco para a saúde. Este risco se agrava quando não são respeitadas as formas de manipulação, comercialização e estocagem.

Diversos gêneros estão descritos na literatura como importantes patógenos e deteriorantes encontrados em produtos cárneos como: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium* spp. entre outros. A existência destes microrganismos nos alimentos pode ter diversas origens: contaminação pelo conteúdo intestinal do animal utilizado como matéria prima, subprocessamento térmico, quebra da cadeia de frio, falta de higiene de manipuladores, contaminação cruzada, falta de higienização de utensílios e equipamentos, etc. Desvios no controle de temperatura de refrigeração resultam no desenvolvimento dos agentes que porventura estiverem presentes no produto. Portanto, pequenos descuidos nas últimas etapas antes de chegar ao consumidor final, colocam em risco todo o trabalho realizado anteriormente.

O contato com manipuladores desde a expedição da indústria, passando pela logística, transportadora e até estocagem final; conferem possíveis riscos de contaminação, seja por perfuração, ruptura da embalagem ou contato direto do produto com diferentes superfícies. No comércio varejista, independentemente da região onde se localiza, existem grandes variedades quanto aos padrões de equipamentos, espaços físicos e público alvo. Nestes estabelecimentos existe uma

gama de diferentes tipos de produtos(não apenas alimentícios) que estão dispostos em constante contato com possíveis contaminantes(químicos, físicos e biológicos). Justamente neste último ponto de grande inconstância os produtos estão vulneráveis à contaminação ou ao seu agravamento.

Tendo em vista a diversidade de estabelecimentos comerciais quanto às características físicas, tecnológicas e sociais, um estudo cruzando diferentes níveis higiênico-sanitários com resultados laboratoriais se mostra de grande importância.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade higiênico-sanitária de linguiças frescas suínas, os estabelecimentos comerciais onde foram adquiridas e confrontar os resultados obtidos com o tipo de estabelecimento fornecedor.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade higiênico-sanitária de linguiças frescas de suínos coletadas em diversos estabelecimentos comerciais em Niterói, Rio de Janeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a temperatura no momento de coleta;
- Estabelecer um padrão higiênico-sanitário dos estabelecimentos conforme Lista de Verificação;
- Realizar a identificação e contagem bacteriana de agentes segundo a Resolução RDC nº12(BRASIL, 2001) como: *Salmonella* spp., Coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva;
- Confrontar os dados laboratoriais obtidos com a Lista de Verificação;
- Comparar dados obtidos no interior da amostra com os de sua superfície;
- Correlacionar as contagens com temperaturas aferidas e a Lista de Verificação;
- Comparar as combinações de meio de cultura para isolamento de *Salmonella* spp.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DA LINGUIÇA

Diversos historiadores puderam resgatar em estudos sobre as tradições e costumes dos povos antigos, os principais tipos de alimentos consumidos, produzidos e comercializados. Seja com o intuito de conservação ou para melhoria do aspecto sensorial, algumas civilizações como chinesa e babilônias já produziam linguiças por volta de 1500 a.C. Na obra *Deiphnosophistae* (*deipnon*-jantar, banquete; *sophistai*-estudiosos, professores) datada do século III a.C., já existiam relatos e receitas de diversos alimentos, inclusive linguiças (MATEUS, 1997).

Conforme os povos foram se desenvolvendo e se instalando em diversas regiões, assim foram sendo caracterizados os alimentos de acordo com a oferta de matéria-prima, clima e gosto dos consumidores. Os povos europeus correspondem com uma grande parcela dos produtos alimentícios que existem hoje, cada qual com seus tipos e quantidades específicos de corte cárneo, especiarias e condimentos. Nas regiões frias, onde o longo inverno favorecia a manutenção do alimento às baixas temperaturas, houve um grande desenvolvimento dos produtos crus ou defumados. Nas regiões próximas ao mar Mediterrâneo, com suas temperaturas mais altas, houve o maior emprego de tecnologias que garantissem a conservação do produto como a salga, dessecação e fermentação, como exemplo dos salames (TERRA, 1998; ZAMBONELLI et al., 1992).

Produtos de origem animal são amplamente processados por diferentes métodos visando tanto a sua apreciação quanto sua conservação. Linguiças frescas são consumidas em grandes quantidades pela população brasileira, seja pelo apelo cultural do churrasco, quanto pelo seu baixo preço. Embutidos, como linguiças, são definidos como alimentos condimentados contidos em envoltório natural ou artificial, cuja elaboração emprega carne de bovinos, suínos ou aves, bem como suas vísceras, podendo ser curado, maturado e/ou dessecado (BRASIL, 2000; CHAVES et al., 2000).

Com o processo de colonização do Brasil, foram trazidas cultura e tradição dos diferentes povos que por aqui se instalaram. No sul do país é possível observar uma grande expressão dos povos da Alemanha e Itália, que se estende até São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo, como no caso do Socol(origem italiana), e salsichas “Bockwurst” e “Weisswurst”(origem alemã).

3.2 PRODUTOS FRESCAIS

Referindo-se propriamente a produtos frescos, vale ressaltar que não são aplicados métodos físicos que assegurem a inocuidade no produto final. Segundo disposto na Portaria nº1.004 (BRASIL, 1998) da Secretaria de Vigilância em Saúde, é autorizada a utilização dos seguintes tipos de aditivos em produtos frescos embutidos ou não: acidulante, regulador de acidez, antioxidante, aromatizante/corante, conservante, estabilizador de cor, espessante, realçador de sabor e umectante.

O colaborador envolvido na produção, bem como facilitadores, como equipamentos e utensílios, podem ser importantes fontes de contaminação, desde que inadequadamente higienizados (CHEVALLIER et al., 2006; PHILLIP; ANITA, 2010). Shojaei et al. (2006) em seu estudo analisaram a eficiência da higienização das mãos dos manipuladores de alimentos com a simples combinação de água e sabão e puderam observar grande redução de 72.7% para 32% na contagem de microrganismos.

Outro ponto importante a ser considerado é a qualidade do envoltório, geralmente tripa natural para linguiças. Com os avanços tecnológicos dos matadouros frigoríficos, foi possível padronizar e melhorar a qualidade no momento de obtenção e processamento deste produto. Após a obtenção, as tripas são esvaziadas, evertidas, lavadas, calibradas, tratadas com ácido, secas e acondicionadas em sal. Em nenhum momento da linha de produção, há tratamentos térmicos que garantam a sua inocuidade, sem assim, a qualidade higiênica de todo processo requer muita atenção afim de não comprometer o produto no embutimento. Roncales et al.(1991) em seu estudo comparativo entre tripa natural e artificial(colágeno) concluíram uma melhor aceitabilidade e qualidade no produto final quando utilizada a tripa natural; isso demonstra como a atenção voltada para o envoltório não deve ser subjugada.

A manutenção da cadeia de frio para este tipo de produto se torna o principal fator que irá manter a qualidade microbiológica. Mesmo assim, diversos pesquisadores apontam não conformidade de equipamentos e padrões em estabelecimento comerciais com relação a este parâmetro (GARRIDO et al., 2010; IPEM-SP, 2010; JOL et al., 2007; JOSHI et al., 2010; KAMDEM et al., 2007; MARTINS et al., 2007; PINTAR et al., 2007). Em produtos altamente manipulados como carne moída, a validade comercial se reduz a menos de dois dias caso a temperatura de estocagem esteja próxima de 37°C(temperatura ambiente) (KANDEEPAN et al., 2010). O semelhante é observado em cortes terciários (cortes comerciais disponíveis nos supermercados) sendo que nestes também são utilizadas outras tecnologias como embalagem com atmosfera modificada e irradiação; o que não descartam a necessidade de manutenção da cadeia de frio (GONZÁLES-MONTALVO et al., 2007).

3.3 ASPECTOS BACTERIANOS DE PRODUTOS CÁRNEOS

O perfil microbiológico deste produto é caracterizado pela presença de aeróbios, aeróbios facultativos, psicrotrófos, mesófilos, os quais são responsáveis pela deterioração, e transmissão de enfermidades (MATARAGAS et al., 2008). Na

Itália, nenhum fármaco antimicrobiano pode ser adicionado. Por esta razão, a refrigeração a 4 °C é a única tecnologia disponível para preservação deste produto(GILL et al., 1995; ZAMBONELLI et al., 1992). Nenhum processo fermentativo ocorre durante o período de estocagem a 4 °C por isso, a qualidade higiênica das matérias-primas é o principal fator que afeta o valor final do produto a ser distribuído para a comercialização(COCOLIN et al.,2004).

Em diversas localidades do mundo são descritos casos de doenças alimentares envolvendo alimentos frescos contaminados por bactérias. A origem destes contaminantes muitas vezes não é elucidada seja pela falta de acompanhamento médico, pela falta de informação do paciente ou devido a subnotificação. Estas situações não trazem apenas prejuízos diretos para os enfermos envolvidos, mas também todo um custo com a perda da produção, saúde coletiva e recursos hospitalares. Isto se agrava ainda mais ao observar que geralmente não é apenas uma pequena fração do lote que foi comprometido, e sim, muitas vezes, a partida inteira; com isso o possível dano a saúde coletiva se eleva (MÜRMAN et al., 2009; SPRICIGO et al., 2008).

Levando em consideração a evolução do transporte de cargas, o tempo que hoje um produto leva do local de produção até a região consumidora, foi drasticamente reduzido. Sendo assim, a divergência nos padrões entre os mercados internacionais não exclui o risco da introdução de uma matéria-prima contaminada no prato do consumidor final. Como exemplo, Pakalniskiene et al. (2009) em seu estudo, encriminaram manjeriço importado utilizado na alimentação de uma escola após um surto envolvendo 200 alunos e professores na Dinamarca.

A determinação do capital gasto com casos de afecções gastrointestinais é uma tarefa muito difícil, seja pela sub-notificação, falta de informação da população ou falta de integração dos sistemas públicos de saúde, dentre outros. Em estudos realizados em outros países, a principal parcela do prejuízo se deve pela perda de produção devido à ausência do acometido ou de seu acompanhante. Na Columbia Britânica, são esperados cerca de 112.000 casos para cada 100.000 indivíduos por ano, estando o custo por caso entre CAN\$122,00 e CAN\$996,00, e a gasto médio anual até CAN\$5.8 bilhões (HENSON et al., 2008).

Segundo Lynch et al.(2006) e Olsen et al.(2000) a etiologia dos principais agentes causadores de surtos relacionados com alimentos são as bactérias em cerca de 55% e 75% entre os anos de 1998-2002 e 1993-1997, respectivamente.

Ainda, relacionaram *Salmonella* Enteritidis com a maioria dos surtos, com relação ao número de acometidos e de óbitos. Ressalta-se ainda, que alguns dos surtos foram relacionados com grandes cadeias de restaurantes e que alguns abrangiam diferentes regiões do país. Lynch et al. (2006) apontou também o expressivo isolamento de *Escherichia coli* O157:H7 e enterointoxicações devido a *Staphylococcus aureus*.

Em análise realizada por Greig e Ravel(2009), através de extensiva procura por surtos de enfermidade intestinal aguda entre 1988 e 2007 no mundo todo, 4093 registros foram computados onde houvessem referência ao tipo de alimento envolvido, patógeno isolado e região. Neste estudo foram atribuídos 46,9% dos casos devido à presença de *Salmonella* Enteritidis e 9,5% à *E.coli*. Nos alimentos, a carne bovina conferia 44,2% dos isolamentos de *E.coli*, a carne suína 21,4% para *S.aueus* e ovos eram responsáveis por 43,4% dos casos de *Salmonella* Enteritidis. Ainda confirmou-se a grande relação entre *Salmonella* spp. com ovos e *E.coli* com gado bovino.

Na literatura especializada existem também, diversos trabalhos envolvendo embutidos secos, curados e/ou fermentados em surtos de gastroenterites. Nestes tipos de produtos devem ser considerados diferentes fatores como características físicas(atividade de água, temperatura e umidade), química(teores de sal, produção de nisina e outras bacteriocinas pelas culturas lácticas, pH desenvolvido, entre outros) e microbiológicos(competição com culturas lácticas) (AMBROSIADIS et al., 2004).

Outro ponto relevante é o material das superfícies de trabalho. A utilização de aço inoxidável em bancadas de trabalho é a melhor indicação, porém estudos evidenciam a capacidade de patógenos em se instalar em tais superfícies (KUSUMANINGRUM et al., 2003; RIVAS et al., 2007). A contaminação cruzada entre superfícies de equipamentos, utensílios e alimentos é uma importante fonte de patógenos regida por interações elétricas, químicas, bioquímicas e físicas (GOULTER et al., 2009). Gounadaki et al. (2008) demonstraram como facas, moedores e tábuas são altamente contaminadas com agentes espoliativos e patogênicos. A utilização correta e frequente de detergentes e sanitizantes tem como principal objetivo a remoção biofilmes além de substrato para a manutenção, fixação e desenvolvimento dos microrganismos(GILL; McGINNIS, 2004). Zeraik e Nitschke(2010) em seu estudo recente sobre remoção de células bacterianas em

superfície de poliestireno com biosurfactantes demonstraram um interessante potencial para tais substâncias (redução de 63-66% na adesão). Tais substâncias biológicas são amplamente utilizadas por diferentes indústrias e estão recebendo grande atenção devido ao seu baixo risco à saúde humana.

A presença de fímbrias e flagelos, a secreção de matrix extracelular, a carga elétrica da membrana celular e da superfície de contato, entre outros, proporcionam comportamentos característicos para cada estirpe (BOWER et al., 1996; GOUNADAKI et al., 2008; KNOBBEN et al., 2007). A parede celular das bactérias possui cargas elétricas em sua superfície que irão depender de seus resíduos e estruturas anexadas conferindo comportamento hidrofóbico ou hidrofílico. Essa característica irá determinar uma melhor ou pior aderência às superfícies de acordo com sua afinidade elétrica (GOULTER et al., 2009).

Em suma, existem diversos pontos de contaminação a serem considerados desde a obtenção da matéria-prima e seus possíveis contaminantes da microbiota intestinal, até a manutenção da cadeia de frio (BERENDS et al., 1996; MICHAELS et al., 2004; SWANENBURG et al., 2001).

3.4 *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA

O gênero *Staphylococcus* pertence a família *Staphylococcaceae* onde encontram-se diferentes espécies e subespécies amplamente distribuídas colonizando mucosas e superfícies corporais de humanos e de outros animais. Seus cocos se coram fortemente pelo cristal violeta conferindo característica de Gram positivo. São imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos e relativamente exigentes quanto ao substrato para crescimento. Possuem capacidade de produzir enzimas como catalase e oxidase além de resistir a altas concentrações (próximas de 12%, sendo 7,5% como fator seletivo em meios de cultura) de sal (HARRIS et al., 2002; MOSSEL et al., 1995).

Alguns autores concordam que seu crescimento vai depender da disponibilidade de nutrientes, bem como os padrões citados anteriormente, sendo a temperatura mínima 8,0°C em condições ótimas. Pela sua presença expressiva em

humanos e devido a sua alta capacidade de produzir e secretar material extracelular em biofilme, sua persistência e aderência à superfície é muito estudada sendo este agente utilizado como indicador da qualidade do procedimento de higiene, tanto pessoal quanto de ambientes e equipamentos (BUCHANAN et al., 1993; CASTILLEJO-RODRÍGUEZ et al., 2002; INGHAM et al., 2007; LINDQVIST, 2006; ; VALERO et al., 2009; VAZ, 2005).

A afecção causada por *Staphylococcus aureus* está muito relacionada com a presença de toxinas: estafiloenterotoxinas(ES) e Toxinas da Síndrome do Choque Tóxico(TSCT). As ES dividem-se em dez tipos (A-E, G-J e U). Estas estruturas protéicas de baixo peso molecular são resistentes tanto a temperatura quanto a proteases. Sua ação no organismo leva pouco tempo (em média 2-6 horas) causando reações como náusea, vômito, diarreia, prostração e dores abdominais. Surtos envolvendo carne suína, bovina, frango, saladas e ovos são comumente relatados pela literatura onde é possível detectar a presença de toxinas, mas nem sempre isolar o agente etiológico (ATANASSOVA et al., 2001; BALABAN; RASOOLY, 2000; LETERTRE et al., 2003; SACHINDRA et al., 2005; SORIANO et al., 2002).

3.5 COLIFORMES TERMOTOLERANTES

São bastonetes Gram negativos da família *Enterobacteriaceae*, não esporulados, anaeróbios facultativos e possuem capacidade de se desenvolver em meio contendo sais biliares ou outros agentes surfactantes. Não produzem oxidase e em temperatura $44,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ são capazes de fermentar a lactose produzindo ácido e gás; sendo assim considerados termotolerantes. Também produzem β -galactosidase(WHO, 1996).

Dentro deste grupo está *Escherichia coli* que representa cerca de 95-99% dos isolamentos. Este agente pode ser classificado segundo sua patogenia e ainda, agrupada em sorogrupos(EPEC, EHEC, EIEC, EAEC, ETEC, DAEC) e sorotipos(segundo características somáticas e flagelares). Com o avanço dos estudos moleculares pôde-se traçar perfis de diversos graus de patogenicidade. O

sorotipo mais estudado é o O157:H7, no entanto diversos novos sorovares emergentes já foram descritos. Tal sorovar é capaz de causar diversos agravos a saúde humana: Síndrome Urêmica Hemolítica, Colite Hemorrágica e Púrpura Trombótica Trombocitopenica(COIA et al., 2001; DOYLE, 1991; EISEL et al., 1997; ERICKSON; DOYLE, 2007).

Está bem elucidado a ubiquidade deste microrganismo no trato gastrointestinal de humanos e de diferentes animais domésticos. (LECLERC et al., 2001). Sendo assim, durante toda a cadeia produtiva as porções cárneas estão em possível risco de contaminação por este agente não apenas pelo contato com o conteúdo intestinal do animais de açougue, mas também pelo contato com superfícies contaminadas e mal higienizadas e manipuladores com hábitos higiênicos insatisfatórios (DEL SERRONE et al., 2006).

3.6 *Salmonella* spp.

Salmonella é um bacilo Gram negativo no esfregaço, não possui capacidade de esporular, é anaeróbio facultativo. Cresce em temperaturas que variam de 8 a 45°C, em pH próximo da neutralidade, geralmente não resiste a temperaturas superiores a 70°C ou pH fora do intervalo de 4,0-8,0. Geralmente não apresenta a capacidade de fermentar a lactose, porém através de troca de plasmídeos, algumas estirpes são capazes de adquirir genes capazes de codificar o aparelho enzimático que fermenta este dissacarídeo. São capazes de reduzir nitratos em nitritos além de produzirem gás a partir da fermentação da glicose (CAMPOS, 2005).

Em diversos países, como no Brasil, *Salmonella* spp. é o principal agente causador de enfermidades vinculadas aos alimentos, sendo responsável por enormes prejuízos. A sua patogenia está envolvida com diferentes mecanismos de invasão e mediação bioquímica. A infecção geralmente é evidenciada após um período de 12 a 72 horas e perdura por 4-7 dias com sintomas de febre, dores abdominais e diarréia(CDC, 2010; COSTALUNGA; TONTO, 2002; GREIG; RAVEL, 2009; LOPALCO et al., 2000; TAUXE, 2002; TSEN et al., 2000). Diversos surtos

envolvendo vários tipos de alimentos se deu pela ação de *Salmonella* spp. (DELHALLE, 2009; SWANENBURG et al., 2001; TAUXE, 2002).

Segundo o que é disposto na Portaria nº12 (BRASIL, 2001) tal microrganismo deve estar ausente em 25g de amostra, porém na literatura especializada estão descritos diversos casos de desacordo com a legislação. Berends et al.(1996) estudando sobre a os riscos durante a criação e o transporte de suínos, observaram a habilidade deste agente em sobreviver no ambiente favorecendo sua manutenção nas granjas e determinou que devido ao estresse durante o transporte, 5-30% dos animais estariam excretando *Salmonella* spp. até o momento do descarregamento no abatedouro. Mataragas et al. (2008) em seu estudo envolvendo perfil de risco de suínos e frango para diferentes tipos de alimentos e patógenos, puderam determinar grande percentual de risco para o agente em todos os tipos de alimentos analisados com exceção de embutidos fermentados, os quais apresentaram baixo risco.

Devido à baixa capacidade deste agente em se estabelecer e prevalecer no meio frente a outros microrganismos mais competitivos, para o sua identificação são empregados diferentes protocolos que empregam combinações de meios em etapas consecutivas. A sequência de meios a utilizar para o isolamento de *Salmonella* spp. ainda não possui um método ideal. Diversos pesquisadores puderam determinar protocolos que muitas vezes não se comportavam da mesma forma conforme eram testados em outras matrizes alimentares(ESCARTIN et al., 1999; KOYUNCU, HAGGBLOM, 2009; MÜRMAN et al., 2008; SPRICIGO et al., 2008).

No presente trabalho será traçado o padrão de qualidade higiênico-sanitário de estabelecimentos comerciais e inocuidade das linguiças frescas suínas oferecidas à população da cidade de Niterói- RJ.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal localizado na Faculdade de Veterinária da UFF, vinculado ao Programa de Pós-Graduação desta Instituição.

4.1 AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de duas marcas de presença mais expressiva no comércio. Os estabelecimentos foram previamente qualificados e aleatoriamente selecionados segundo uma Lista de Verificação: sendo três do grupo A, cinco do B e quatro do C. Destes foram coletadas no total 93 amostras durante o período de oito meses. As linguiças coletadas foram embaladas em filme plástico, acondicionadas em caixa poliestireno expandido com gelo reciclado e transportadas ao Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal Fluminense. Foi aferida a temperatura no ponto de coleta. No laboratório foram realizadas contagem de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* spp.

4.2 ELABORAÇÃO E REALIZAÇÃO DA LISTA DE VERIFICAÇÃO

A partir de diversas listas de verificação e o que está disposto na Portaria nº368, de 04 de setembro de 1997, MAPA e Portaria nº1210 de 03 de agosto de 2006, SMS-SP, foi elaborado um material próprio onde visou-se a checagem de pontos críticos para a higiene e sanidade dos estabelecimentos no setor de carnes e embutidos.

Foram considerados apenas os itens visuais com o intuito de melhor exemplificar o comportamento do consumidor usual. Estes se distribuíram por 36 itens que foram agrupados em:

- Edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios - onde foram concentrados todos os pontos estruturais e físicos que pudessem contribuir para a qualidade do alimento.

- Higienização de instalações, equipamento, móveis e utensílios - neste foram analisados os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional(PPHO) e Procedimentos Sanitários Operacionais(PSO) de forma abrangente.

- Controle de verotes e pragas urbanas- este ponto foi incluído com o intuito de pesquisar presença ou ausência bem como medidas de controle.

- Manipuladores - como último grupo foram dispostos itens que focassem o asseio pessoal além da higiene, hábitos impróprios e porte de objetos que conferissem risco de contaminação.

Com esta Lista de Verificação foram analisados e graduados estabelecimentos em três grupos em escala decrescente em conformidade com a pontuação obtida (apêndice, página 69).

Para o preenchimento da lista foi estipulado um tempo de dez minutos para a observação dos itens em análise. Dos 19 mercados visitados foram sorteados de acordo com o percentual de conformidade três estabelecimentos do grupo A(>70%), seis do grupo B(50-69%) e quatro do grupo C(<50%), de onde foram obtidas as amostras.

4.3 ELEIÇÃO DA MARCA A SER ANALISADA

Foram selecionadas as cinco marcas de maior distribuição dentre os mercados visitados, e duas foram sorteadas (marca Alpha e marca Beta) para a obtenção das unidades amostrais.

4.4 MEDIÇÃO DA TEMPERATURA

Por meio de termômetro digital com haste foi aferida a temperatura no centro geométrico do produto, aproximadamente 2,0 cm da superfície.

4.5 ANÁLISE BACTERIOLÓGICA

As metodologias empregadas foram baseadas na Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (BRASIL, 2003).

4.5.1 Preparo das amostras e alíquotas

Antes da abertura das embalagens, foi realizada a assepsia das mesmas com álcool 70%. Então foram abertas com o auxílio de tesoura, pinça e bisturi esterilizados; dentro da zona de segurança do bico de Bunsen.

Para a amostra superficial foram utilizados suabe e gabarito (10cm²) esterilizados. Com o suabe umedecido em 1mL solução salina peptonada tamponada 1,0% (ou água peptonada tamponada, APT) friccionou-se em duas direções perpendiculares entre si por toda área delimitada pelo gabarito em duas regiões

distintas dos gomos totalizando 20cm². Após a coleta, o material foi acondicionado em tubo contendo 9mL da mesma solução e homogenizado em aparelho vortex para melhor desprendimento das células (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2008)

Para a amostra interna foram retiradas alíquotas dos gomos de cada amostra, totalizando 25g, homogenizadas em embalagens plásticas esterilizadas, no equipamento “stomacher” com 225mL de solução salina peptonada 0,1%, obtendo-se assim diluição 10⁻¹. A partir desta diluição foram transferidas alíquotas de 1,0mL para tubo de ensaio contendo 9,0mL de solução salina peptonada a 0,1%, formando assim a diluição de 10⁻² e sucessivamente a diluição 10⁻³. Estas diluições foram consideradas para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizado procedimento semelhante ao anterior porém utilizando-se APT 1,0% e foi considerada apenas a diluição 10⁻¹.

A partir destas diluições foram realizados os mesmos procedimentos para pesquisa dos agentes em questão para ambos os tipos de amostra(interior e superficial).

4.5.2 Contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para enumeração, isolamento de colônias e identificação de *Staphylococcus* coagulase positivo foi empregado o plaqueamento em Agar Baird-Parker com telurito de potássio, enriquecido com emulsão a 50% de gema de ovo.

Foram inoculadas segundo técnica de “spread plate”, 0,1mL das diluições em Agar Baird-Parker e posterior incubação em estufa à 37°C/24-48 horas. Neste meio estão presentes como substâncias seletivas cloreto de lítio e telurito de potássio. O pigmento desenvolvido se dá pela redução do telurito de potássio. O meio também contém emulsão de gema de ovo que serve como agente diferenciador, uma vez que *S.aureus* produz lecitinase que lisa a lecitina promovendo os halos translúcidos.

A leitura foi efetuada na placa contendo 20-200 colônias onde foram contadas tanto as colônias típicas (pretas brilhantes com halo) como atípicas(acinzentadas sem halo)(figura 1 e 2). Foram repicadas três a cinco colônias de cada tipo,

semeadas em tubo contendo caldo “Brain Heart Infusion” (BHI) e incubadas em estufa à 37°C/24h.

A confirmação bioquímica foi realizada através das provas de catalase, coagulase e coloração de esfregaço pelo método de Gram. O caldo BHI teve como objetivo a obtenção de culturas jovens(em fase log de crescimento) com todo o seu aparelho enzimático funcional avaliado nas provas bioquímicas.



Figura 11 Crescimento característico para *Staphylococcus* spp. em ágar Baird-Parker em diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}

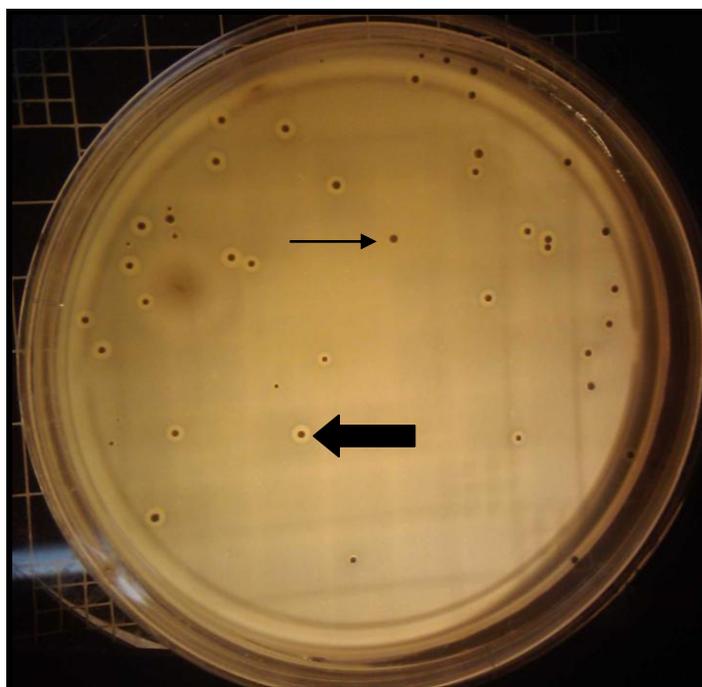


Figura 12 Crescimento característico de *Staphylococcus* spp. em ágar Baird-Parker. A seta larga aponta um padrão típico(pretas com halo de lise), a seta delgada, padrão atípico(pretas ou acinzentadas sem halo de lise)

Na coloração de Gram *Staphylococcus* spp. coagulase positivo apresenta padrão morfo tinturiais de Gram positivo, sendo os cocos corados mais fortemente pelo cristal violeta(figura 3). O arranjo em cacho demonstra o seu padrão de multiplicação em múltiplos eixos.

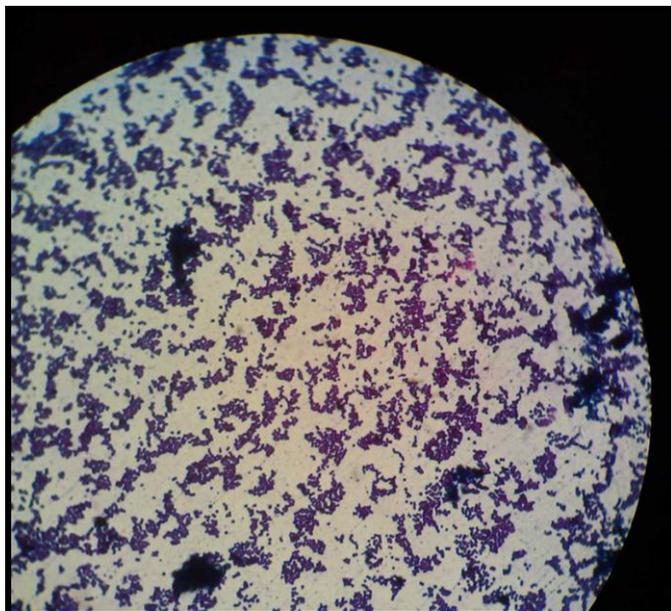


Figura 13 Coloração segundo Gram - visualização de cocos fortemente corados por cristal violeta em caixo, sugestivo de *Staphylococcus* spp. Utilizando lente objetiva de 100X.

Na prova de Catalase retirou-se uma alçada da suspensão de BHI e transferiu-se para uma lâmina. Gotejou-se peróxido de hidrogenio a 3%. Foi considerado positivo quando houve efervescência(figura 4). Esta enzima protege a célula bacteriana do efeito tóxico do peróxido rompendo o mesmo em H_2O e $\frac{1}{2} O_2$.

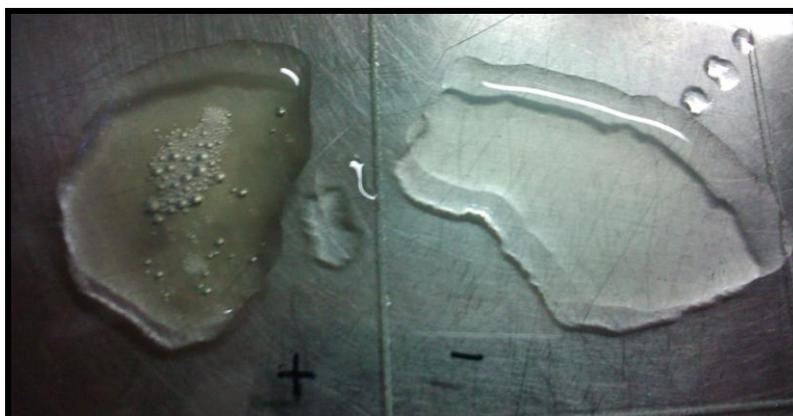


Figura 14 Prova da catalase, a esquerda um resultado positivo com borbulhas; a direita, negativo.

Prova de coagulase: inoculação 0,3mL da suspensão em BHI para tubo contendo 0,3mL de plasma de coelho e incubação à 37°C/6h. Foram considerados positivos os casos onde houve formação de depósito de fibrina ou coagulação da suspensão(figura 5). Esta enzima transforma o fibrinogênio em fibrina, como um mecanismo de defesa, uma vez que a célula envolta pelo coágulo, se torna mais difícil de ser reconhecida pelo sistema imune e fagocitada.

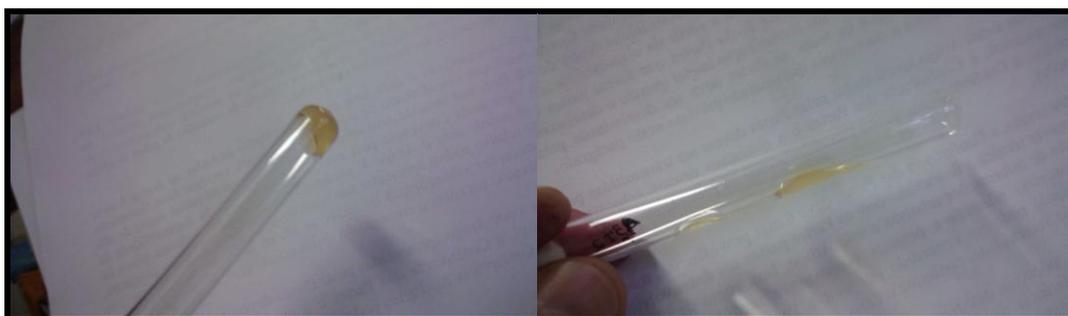


Figura 15 Prova da coagulase, a esquerda um tubo onde houve coagulação total da suspensão; e a direita, coagulação em menor intensidade

4.5.3 Contagem de coliformes coliformes termotolerantes

Utilizando as diluições em solução salina peptonada 0,1% foi inoculado 1mL em placa através da técnica de “pour plate” com meio Ágar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA) e incubado em estufa à 37°C/24-48 horas. Neste meio estão presentes substâncias que inibem o desenvolvimento de Gram positivos, como sais biliares e cristal violeta.

Após este período, foi realizada a contagem da placa padrão contendo 15-150 colônias separando colônias típicas e atípicas (róseas com 0,5-2,0 mm com/sem halo de precipitado, respectivamente) para obtenção do resultado presuntivo(figura 6).

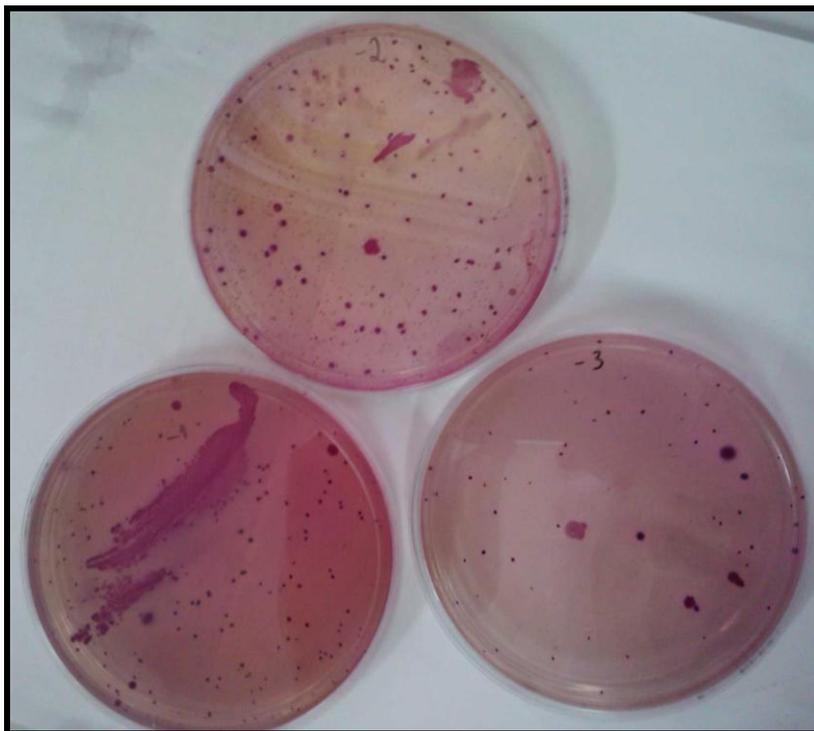


Figura 16 Crescimento sugestivo de coliformes em ágar VRBA. Os números -1, -2 e -3 correspondem às diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3})

Foram repicadas três a cinco colônias de cada tipo utilizando agulha de platina, inoculadas em tubo contendo caldo *Escherichia coli* (EC), e incubadas em banho-maria à $44,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ /24-48 horas. Foram considerados positivos onde houve presença de gás nos tubos de Durham ou efervescência quando agitado gentilmente (figura 7).



Figura 17 Tubo com meio EC com comportamento característico para coliformes fecais (presença de gás no interior do tubo de Durham, delimitado pelo círculo)

A partir da lactose, o microrganismo obtém energia com a fermentação em ácido e gás. Este último acaba sendo visualizado quando aprisionado nos tubos de Durham ou na efervescência quando o tubo for agitado suavemente.

4.5.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A metodologia utilizada para o isolamento de *Salmonella* spp. consistiu nas seguintes etapas: 1) pré-enriquecimento de 25g de amostra em 225mL de água peptonada tamponada 1,0%; 2) enriquecimento seletivo em caldos Selenito Cistina e Rappaport Vassiliadis e 3) isolamento em três meios sólidos seletivos (Ágar Bismuto Peptona Lactose Sacarose, Ágar Hektoen e Ágar McConkey-Lactose). Este protocolo se deve pela baixa capacidade deste agente em prevalecer frente a competição por microrganismos mais eficientes presentes no meio.

Para o pré-enriquecimento foi empregada a diluição 10^{-1} em APT 1,0% que foi incubada em estufa à 35°C/16h. Este caldo possui fosfato dissódico hidrogênio e

fosfato monopotássico hidrogênio como tampão para evitar grandes variações no pH que possa inviabilizar o crescimento celular.

A partir deste cultivo foi pipetado 1,0mL para inoculação em tubo contendo 10,0mL de caldo Selenito Cistina(SC), e 0,1mL em outro contendo 10,0mL de Rappaport-Vassiliadis(RV). Estes foram incubados em banho-maria a 41°C/24h, conferindo assim o enriquecimento seletivo. O caldo SC possui em sua constituição L-cistina que melhora a recuperação de *Salmonella* spp. No caldo RV há verde maquita que age como seletivo inibindo demais bacterias intestinais.

A partir dos cultivos em Selenito Cistina e Rappaport-Vassiliadis, foram inoculadas duas séries de placas contendo ágar Bismuto Peptona Lactose Sacarose (BPLS), ágar Hektoen e ágar McConkey lactose; uma para cada tubo de enriquecimento. As placas foram incubadas em estufa a 35°C/24h(figura 8).



Figura 18 Comportamento sugestivo de *Salmonella* spp. nos meios de plaqueamento seletivo BPLS, Hektoen e McConkey lactose(da esquerda para direita)

Foram considerados sugestivos as colônias com os seguintes comportamentos: BPLS, colônias e meio cor cereja avermelhada; Hektoen, azuis ou azul esverdeado, com ou sem centro preto; e McConkey lactose, translúcidas sem viragem do meio.

Do cultivo seletivo foram repicadas colônias típicas para inoculação em tubo contendo meio “Triple-Sugar-Iron” (TSI) para a realização das provas de triagem. Após a incubação em estufa à 35°C/18h realizou-se a leitura, admitindo positivo para *Salmonella* spp.: bisel cor cereja, base amarelada e centro com/sem a presença de pigmento preto (figura 9). Neste meio estão presentes lactose, sacarose e glicose, sendo o último em concentração dez vezes menor que os demais; além de tiossulfato de sódio e sulfato ferroso. O agente em questão fermenta em

anaerobiose, apenas a glicose, e como o monossacarídeo se encontra em baixa concentração, o ácido produzido não consegue se difundir por todo o tubo, se concentrando apenas no fundo e na coluna. No bisel, o metabolismo protéico resulta em compostos alcalinos que mantêm o pH na faixa básica. Em alguns casos há a utilização do tiosulfato ferroso como acceptor de elétrons o reduzindo a sulfito e produzindo H_2S que se torna preto em contato com sulfato ferroso. Pode haver ou não produção de gás que se armazena entre a parede do tubo e o ágar ou no próprio meio. Há ainda o indicador de pH vermelho de fenol que na faixa alcalina apresenta coloração cereja e na ácida, amarela.

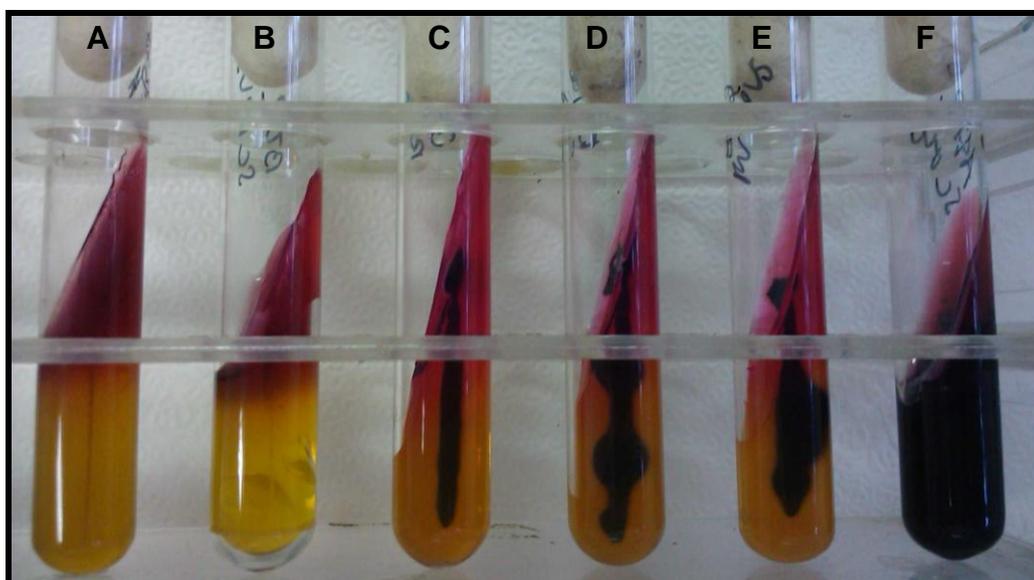


Figura 19 Cultivos em ágar TSI com comportamento sugestivo para *Salmonella* spp.: (A) sem formação de H_2S ou produção de gás; (B) sem H_2S e com produção de gás, (C)(D)(E)(F) diferentes graduações de formação de H_2S e sem produção de gás

De cada tubo cuja indicação era sugestiva para *Salmonella* spp., foi realizada reação sorológica com antígeno somático O para determinação do sorogrupo (figura 10) utilizando o soro polivalente somático O (Probac-São Paulo/SP).

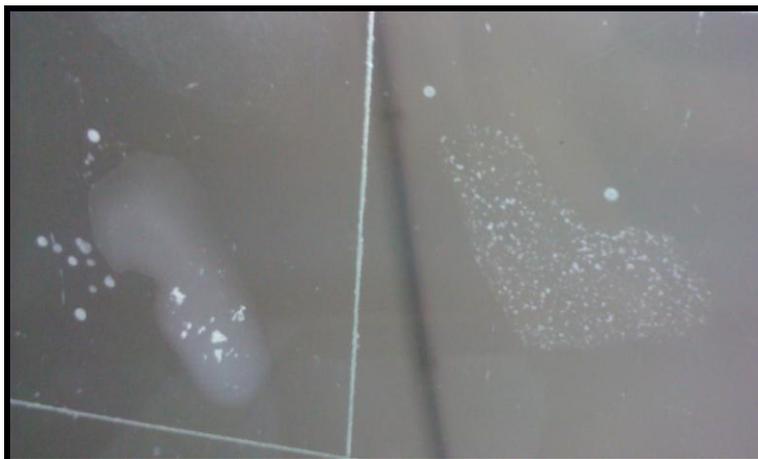


Figura 10 Prova de soloaglutinação, a esquerda está um resultado negativo e na direita, um positivo

4.5.5 Determinação e cálculo dos resultados

Para as contagens internas foram multiplicados os casos positivos para o agente em questão pelo fatores de correção da diluição e de inoculação e expressos em UFC/g. O resultado final foi obtido somando os valores de N tando das típicas quanto das atípicas, segundo a fórmula:

$$N = f_d \times f_i \times c/R \times C$$

C- nº de UFC contadas na placa

R- nº UFC repicadas;

c- nº UFC confirmadas;

f_d -fator de correção de diluição (10, 100 e 1000 quando considerados 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente);

f_i -fator de correção de inoculação (10 e 1 quando inoculados 0,1mL e 1,0mL, respectivamente);

N-resultado final

Para as contagens superficiais foi realizado procedimento semelhante ao anterior porém expresso em UFC/cm². Utilizou-se ainda um procedimento para converter estes resultados em UFC/g, da seguinte forma: foram obtidos oito frações

de 10cm² do envoltório dos gomos que foram posteriormente pesados para a obtenção de peso médio. A partir desta média foi calculado um fator de correção que foi aplicado aos valores superficiais para então ser possível sua análise estatística confrontando com as contagens internas.

4.5.6 Análise estatística

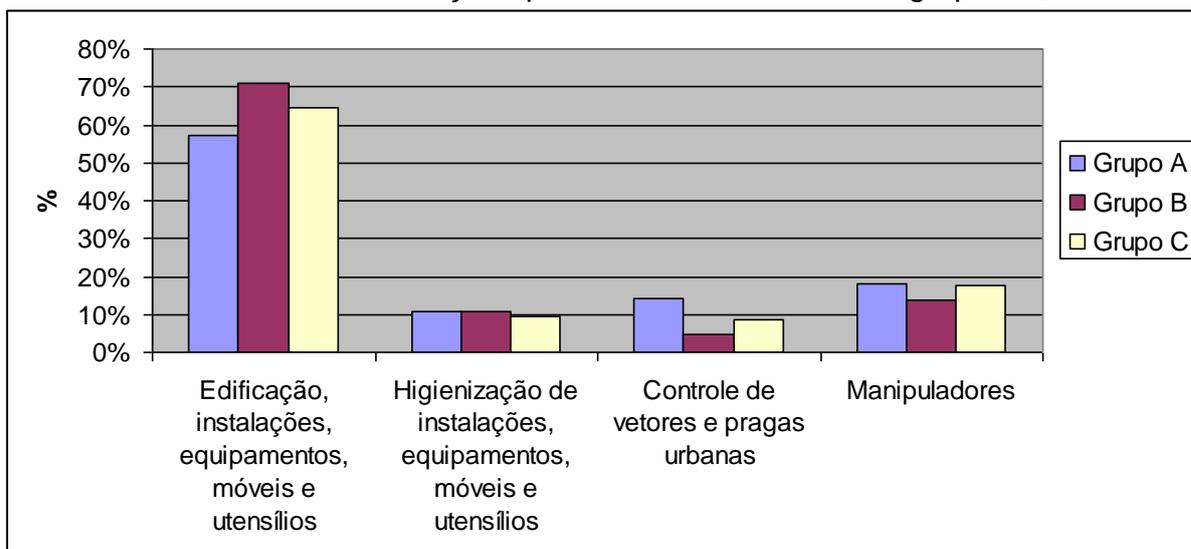
Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism 5 por ANOVA e havendo diferença estatisticamente significativa, foi realizado o teste de Tukey com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LISTA DE VERIFICAÇÃO

Com a lista de verificação foi possível observar a distribuição dos pontos de não-conformidade de acordo com o grupo como disposto na figura 11. A detalhamento destes pontos observados está disposto no apêndice(tabela 7). Individualmente os mercados obtiveram os seguintes percentuais de conformidade: grupo A, A1(79%), A2(78%), A3(72%); grupo B, B1(69%), B2(69%), B3(66%), B4(60%), B5(56%), B6(50%); e grupo C, C1(48%), C2(44%). C3(42%), C4(28%),

Figura 11 Disposição dos percentuais de não conformidade no grupos de itens observados da Lista de Verificação aplicada nos mercados dos grupos A, B e C



Para o grupo de melhor qualidade higiênico-sanitária (grupo A) foi observada não conformidade em 18 (50%) itens dos 36 possíveis sendo os pontos acerca da ventilação de ar, instrução para correta higienização das mãos, presença de armadilhas/dispositivos para controle de vetores e pragas, e realização correta da higienização das mãos os principais pontos críticos, presentes em todos os estabelecimentos visitados.

Para o grupo intermediário (grupo B) estavam presentes 25 (70%) dos possíveis itens de não-conformidade. Os pontos mais observados se destacaram em dois arranjos: o primeiro representando 7,69% cada, ficaram os itens referentes a higienização das mãos como instrução, presença de sabonete líquido e sistema de secagem eficiente; já no outro, com 6,15% cada, estavam os itens acerca dos coletores de resíduos, ventilação do ambiente e utensílios para a higienização das instalações.

No último grupo (C) foi possível visualizar quase a totalidade dos itens (31/36 (86%)). Além dos pontos observados nos grupos anteriores, foram fortemente pontuados a ausência de protetores para os dispositivos de iluminação, presença de sujidades em excesso no interior dos estabelecimentos, presença de vetores e a falta de uniformidade de vestimenta dos funcionários.

Em algumas visitas pode-se observar o emprego de vassouras destinadas a limpeza do chão para a higienização de paredes e bancadas, bem como panos sugestivos de frequente e repetido uso em diversas superfícies. Em dois dos mercados da graduação B foi possível presenciar o momento onde consumidores retribuíam o atendimento com cédulas ou moedas que eram entregues diretamente às mãos dos colaboradores. Nenhum momento do presente trabalho foi observado o emprego de substâncias desinfetantes durante o período de coleta de amostras. Tais observações confirmam a falta de preparo tanto dos funcionários quanto dos supervisores quanto à noções básicas de PPHO, PSO e Boas Práticas de Fabricação (PHILLIP; ANITA, 2010). Isso põe em risco toda atenção voltada para tais diretrizes nas etapas anteriores.

Shojaei et al. (2006) no estudo sobre lavagem de mãos de manipuladores de alimentos no Irã demonstrou uma redução na frequência de isolamento de patógenos de 72,7% para 32% com a utilização de água e sabão. O que vai de encontro com os dados observados, uma vez que os principais pontos de não conformidade com a Lista de Verificação foram os itens relativos ao asseio pessoal e higiene das mãos.

Diante do disposto, não há falta de substâncias (sanitizantes e desinfetantes) ou conhecimento sobre o risco de contaminação de superfícies, e sim, ausência de fiscalização e/ou correto procedimento de higienização. Noções básicas de higiene poderiam assegurar a inocuidade dos alimentos, porém justamente na etapa anterior ao contato com o consumidor final, foi evidenciado um enorme descuido que pode por em risco todo o esforço empregado na produção.

5.2 MARCAS COMERCIAIS

Não houve diferença signativa entre as marcas analisadas, então os resultados foram considerados como de mesma origem. As marcas eleitas são provenientes de indústrias inspecionadas pelo Sistema de Inspeção Federal e provavelmente possuem níveis próximos de sanidade assim que são expedidas. Para a fiel definição deste ponto, seriam necessárias coletas e análises de amostras no ponto de expedição, o que não foi realizado no presente trabalho tendo em vista o deslocamento, tempo disponível e quantidade de análises a serem efetuadas.

5.3 TEMPERATURA

Durante as visitas procurou-se coletar a temperatura fornecida pelos equipamentos que continham os produtos a serem pesquisados porém a grande maioria dos dispositivos se encontrava coberto, quebrado ou descalibrado; o que resultou em grande disparidade entre os valores fornecidos e os aferidos. Sendo assim, não foi julgada relevante a sua utilização.

Foram obtidas 92 tomadas de temperatura dos quais 61(66%) destas se encontravam acima do máximo sugerido pelo fabricante(4 °C) como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1 Disposição das temperaturas internas no momento de coleta e seus percentuais dentro de cada grupo

	Conforme(≤ 4 °C)	Não conforme(> 4 °C)	Total coletado
Mercados A	6 (28,6%)	15 (71,4%)	21(100%)
Mercados B	15 (36,6%)	26 (63,4%)	41(100%)
Mercados C	10 (33,3%)	20 (66,7%)	30(100%)

Os mercados do grupo A representaram o maior percentual de não conformidade dentre cada grupo, o que pode ter favorecido negativamente com relação a contagem dos agente indicadores de contaminação.

As temperaturas variaram de -4,6 e 15,6 °C tendo como média 5,2 °C(±4,5) dentre todos os mercados. Independentemente da graduação do estabelecimento houve diferença significativa($p<0,05$) quando comparadas as mensurações individuais (tabela 2).

Tabela 2 Disposição de média e desvio padrão de temperatura dos diferentes mercados($p<0,05$)

	Média(°C)
A1	10.8 ^{adefgh} ±3.6
A2	3.4 ^{cdefghijkl} ±2.9
A3	5.3 ^{abcdeefghijkl} ±1.1
B1	3.3 ^{cdefghijkl} ±4.2
B2	5.9 ^{abcdeefghijkl} ±3.8
B3	5.8 ^{abcdeefghijkl} ±4.4
B4	1.1 ^{dfghijkl} ±3.8
B5	6.8 ^{abcefghijkl} ±1.9
B6	5.3 ^{abcdeefghijkl} ±2.7
C1	2.2 ^{cdefghijkl} ±3.4
C2	6.1 ^{abcdeefghijkl} ±3.2
C3	4.9 ^{abcdeefghijkl} ±6.8
C4	10.7 ^{bdefgh} ±1.6

Pode-se observar a grande disparidade dos valores médios e seus respectivos desvios padrão o que pode ter contribuído para o crescimento microbiano além de favorecer a transferência de células entre superfícies. Em 1995 Gill et al. descreveram a importância da manutenção da cadeia de frio e sugeriram 0°C como o limite máximo para produtos refrigerados, ainda, ressaltaram o perigo na grande variedade de padrões observados em diferentes estabelecimentos comerciais. Semelhante ao observado no presente trabalho, a grande diversidade de equipamentos, tamanhos e tipos de mercados dificulta a padronização e manutenção da cadeia de frio o que acaba por possibilitar perda da qualidade do produto.

Os mercados A1 e C4 tiveram resultados muito semelhantes mesmo sendo o primeiro o de maior pontuação e o segundo de menor pontuação no quesito Lista de

Verificação. Tanto o mercado A1 como o C4 se diferenciaram significativamente ($p < 0,05$) dos mercados A2, B1, B3 e C1. Estes quatro conferiram baixos valores para o parâmetro analisado.

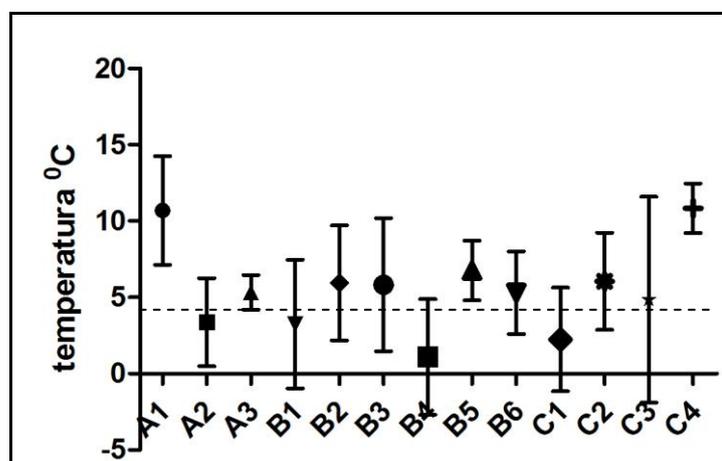


Figura 12 Disposição em gráfico de média e desvio padrão de temperatura dos diferentes mercados. A linha tracejada representa o limite máximo sugerido pelo fabricante para amostras refrigeradas(4°C)

Com relação ao desvio padrão, a partir da figura 12 observou-se a tendência de manutenção da temperatura que variou pouco dentro dos valores obtidos para os mercados A3, B5 e C4. Supõe-se então que os dispositivos de frio pudessem estar configurados para temperaturas incorretas, uma vez que tais equipamentos conseguiram manter valores equilibrados durante todo o experimento. Nos outros mercados houve grande variação nas temperaturas coletadas, isto pode ter sido ocasionado por falta de atenção e manutenção(descalibrados) prestada aos equipamentos. Os balcões de frio devem ser capazes de manter a temperatura configurada impedindo grandes variações.

Em um estudo realizado pelo Instituto de Pesos e Medidas do Estado de São Paulo em março de 2010 sobre temperatura nas gôndolas de super e hipermercados de três cidades do litoral de São Paulo, foi conferida não conformidade em 71% dos produtos analisados. Nesta análise ainda foi observado que 96% dos produtos apresentavam algum tipo de risco microbiológico com temperaturas que variaram de 6,5°C(bife de patinho) a 20,9 °C(prato pronto para consumo a base de maionese e legumes). Ainda, 88% dos produtos apresentaram resultados positivos para bolores e leveduras e 8% para coliformes fecais(IPEM-SP, 2010).

A manutenção da cadeia de frio é um dos principais fatores para a garantia da qualidade e inocuidade do produto final. González-Montalvo et al.(2006) em estudo envolvendo atmosfera modificada e temperatura em carne de avestruz demonstraram como a estocagem em temperatura entorno de 10°C conferia cerca de redução de 33% na validade comercial quando comparada com 4°C. Kandeepan et al. (2010) em sua pesquisa envolvendo carne de búfalo moída e temperaturas de armazenamento, observaram que em ambiente(37±1°C) o prazo de validade se restringe a apenas dois dias. De fato, em diversos momentos do estudo em apreço, havia não conformidade na temperatura no momento de coleta e posteriormente no laboratório foram obtidos altos valores na contagem dos microrganismos.

Em diversos países não apenas intuições de pesquisa, como órgãos governamentais estão constantemente a procura de modelos matemáticos e teóricos que consigam prever a validade comercial dos produtos. Uma das principais diretrizes destes moldes são as faixas de temperatura(GARRIDO et al., 2010; JOL et al., 2007; JOSHI et al., 2010; PINTAR et al., 2007). Isto ratifica a importância da temperatura.

Um estudo em Pernambuco sobre linguiças frescas comercializadas no município de Solânea em discordância com o presente trabalho, foi evidenciado grande percentual de estabelecimentos (83%) que dispunham de freezer. As temperaturas registradas destes mercados obtiveram média 2,1°C (± 3,94) sendo que dois dos 17% não conformes, atingiam valores entorno de 30,0°C, onde não haviam equipamentos de refrigeração(MARTINS et al., 2007).

Diante deste resultados, algumas considerações devem ser feitas: grande não conformidade de temperatura, falta de manutenção dos dispositivos de refrigeração, além dos pontos visuais não terem sido capazes de detectar diferença significativa entre os mercados e os itens analisados na lista não garantiram relação diretamente proporcional à manutenção da cadeia de frio.

5.4 CONTAGEM BACTERIOLÓGICA

Foram considerados 87 cultivos bacterianos para a contagem dos microrganismos, onde cada mercado foi representado por seis a sete coletas, com

exceção do estabelecimento B6 onde apenas cinco coletas puderam ser realizadas. Além disso, foi considerado segundo disposto na resolução RDC nº12 (BRASIL, 2001), os limites máximos tanto para coliformes termotolerantes quanto *Staphylococcus* coagulase positiva, o valor de 5×10^3 UFC/g o que transformado em \log_{10} confere o valor 3,70.

5.4.1 *Staphylococcus* coagulase positiva

Os valores de média $[\log(X+1)]$ e desvio padrão para as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva estão demonstrados na tabela 3. Os valores das linhas foram gerados de dados de unidades diferentes (UFC/cm² e UFC/g) e devem ser analisados separadamente.

Tabela 3 Disposição de médias em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus coagulase positiva*. Os dados devem ser analisados em coluna, uma vez que as unidades das contagens das unidades formadoras de colônias de superfície e interior são diferentes entre si (UFC/cm² e UFC/g). As letras maiúsculas seguidas de números correspondem aos estabelecimentos analisados.

Estabelecimento	Superfície	Interior
	Média [$\log(X+1)$]	Média [$\log(X+1)$]
A1	1.33 ^a ±1.28	1.39 ^b ±1.71
A2	1.60 ^a ±1.18	2.72 ^b ±1.33
A3	1.29 ^a ±1.11	2.10 ^b ±1.45
B1	1.23 ^a ±0.90	1.02 ^b ±1.04
B2	1.35 ^a ±1.41	2.04 ^b ±1.58
B3	1.96 ^a ±1.17	2.61 ^b ±1.40
B4	1.63 ^a ±1.25	1.02 ^b ±1.65
B5	2.13 ^a ±1.69	2.06 ^b ±1.06
B6	1.10 ^a ±1.15	1.58 ^b ±1.58
C1	2.20 ^a ±1.35	1.96 ^b ±1.92
C2	1.71 ^a ±0.89	1.92 ^b ±1.37
C3	1.80 ^a ±1.33	2.30 ^b ±1.72
C4	2.85 ^a ±1.28	2.98 ^b ±1.31

Valores acompanhados de letras minúsculas diferentes são estatisticamente distintos ($p < 0,05$).

Os valores para contagem do agente em questão não se diferiram estatisticamente tanto dentre as superfícies quanto dentre seus interiores ($p < 0,05$). Independente da qualificação do estabelecimento, a concentração de células se mostrou semelhante por todo o experimento (figuras 13 e 14). Todas médias das amostras internas estavam dentro do padrão exigido pela legislação vigente. Porém, vale citar que os mercados A2, A3, B3, B4, C1, C3 e C4 possuíam ao menos uma contagem que excedia o valor máximo permitido, o que confere assim, risco de saúde para o consumidor como enterointoxicações e infecções alimentares.

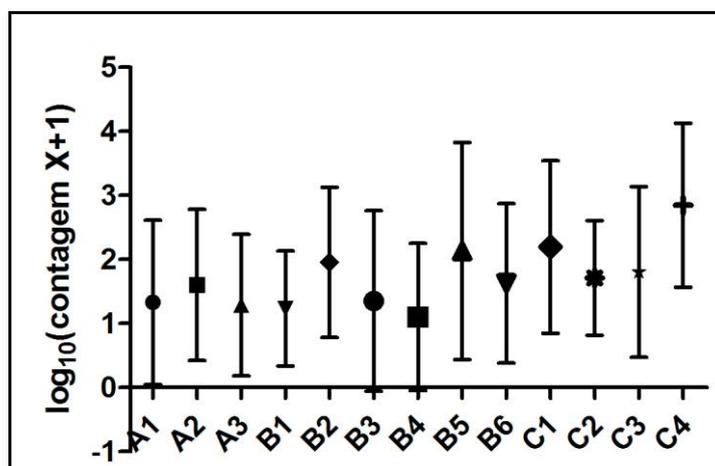


Figura 13 Disposição em gráfico dos valores de média em log de unidade(X+1) e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva na superfície das amostras. Os símbolos representam os valores de média de cada estabelecimento.

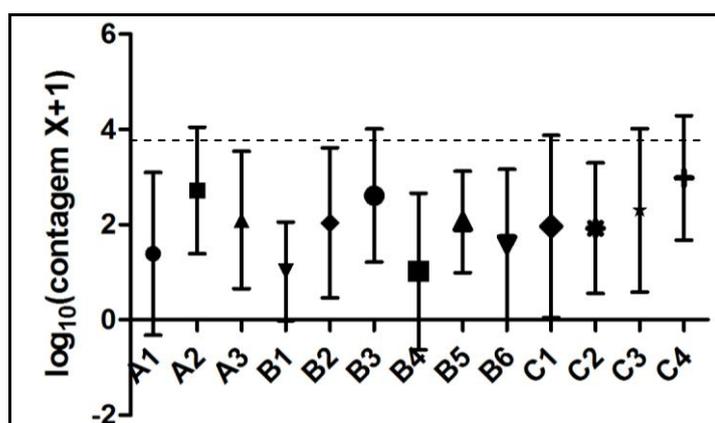


Figura 14 Disposição em gráfico dos valores de média em log de unidade(X+1) e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva no interior das amostras. A linha tracejada representa o limite máximo permitido para amostra indicativa(5×10^3 UFC/g). Os símbolos representam os valores de média de cada estabelecimento.

Visualmente pode-se observar uma maior variação entre as médias das amostras internas dos estabelecimentos. Não parece haver nenhum padrão dentro de cada grupo, o que pode significar que independentemente da qualidade higiênico-sanitária do mercado, há uma constância em algum item de não conformidade. Ou ainda, que tal contaminação seja oriunda da planta industrial.

Todas as médias se encontraram dentro do limite permitido. Porém pode-se observar como os estabelecimentos A2, B3, C1, C3 e C4 possuíam seus desvios padrão acima deste máximo permitido.

5.4.2 Coliforme Termotolerante

Os valores de média [$\log(X+1)$] e desvio padrão para as contagens de coliforme fecal estão demonstrados na tabela 4. Os valores das linhas foram gerados de dados de unidades diferentes (UFC/cm² e UFC/g) e devem ser analisados separadamente.

Tabela 4 Disposição de médias em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de coliforme fecal. Os dados devem ser analisados em coluna, uma vez que a unidade das contagens de superfície e interior são diferentes entre si (UFC/cm² e UFC/g). As letras maiúsculas seguidas de números correspondem aos estabelecimentos analisados.

Estabelecimento	Coliforme fecal superficial	coliforme fecal interior
	Média [$\log(X+1)$]	Média [$\log(X+1)$]
A1	0.00 ^a ±0.00	0.87 ^b ±1.51
A2	0.00 ^a ±0.00	1.17 ^b ±1.28
A3	0.00 ^a ±0.00	1.17 ^b ±1.43
B1	0.00 ^a ±0.00	1.06 ^b ±0.99
B2	0.98 ^a ±0.86	1.12 ^b ±1.38
B3	0.00 ^a ±0.00	1.71 ^b ±1.40
B4	0.98 ^a ±0.86	0.61 ^b ±1.49
B5	0.19 ^a ±0.45	0.32 ^b ±0.78
B6	0.12 ^a ±0.24	0.37 ^b ±0.82
C1	0.23 ^a ±0.43	0.49 ^b ±0.86
C2	0.00 ^a ±0.00	1.03 ^b ±1.30
C3	0.37 ^a ±0.91	1.37 ^b ±1.54
C4	0.58 ^a ±0.99	1.08 ^b ±1.38

Valores acompanhados de letras minúsculas diferentes são estatisticamente distintos ($p < 0,05$)

Segundo a ANOVA, houve diferença estatisticamente significativa apenas para as amostras superficiais ($p = 0,008$). A visualização dos dados pode ser melhor compreendida nas figuras 15 e 16. Todas as amostras internas estavam dentro do padrão exigido pela legislação vigente. Quanto ao limite máximo permitido, todos os mercados se encontraram em conformidade com a legislação vigente.

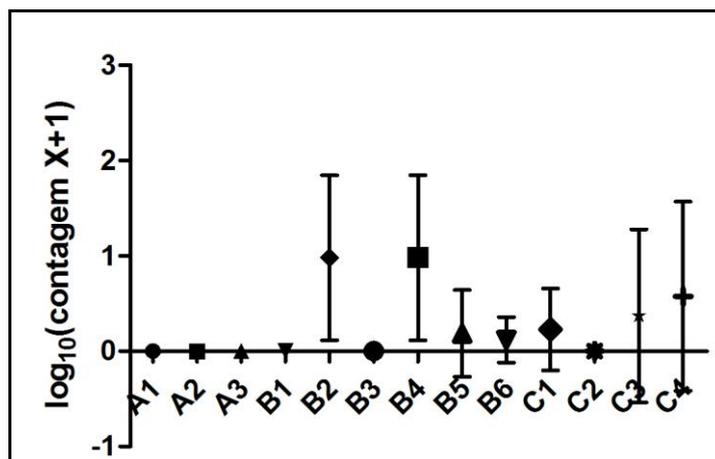


Figura 15 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de coliforme fecal na superfície das amostras. Os símbolos representam os valores de média de cada estabelecimento.

Segundo dados contidos neste gráfico houve um bom padrão higiênico-sanitário para todos os mercados pesquisados. Os valores variaram pouco em todos os estabelecimentos e em apenas quatro deles as contagens absolutas foram próximas de 100 UFC/cm² (B2, B4, C3 e C4). Isto se põe em discordância com os itens observados na lista de verificação onde os pontos mais observados em todos os grupos foram justamente aqueles relativos a higienização de mãos. Esta baixa contagem de coliforme termotolerante pode se dar pela capacidade de transferência entre superfícies deste agente.

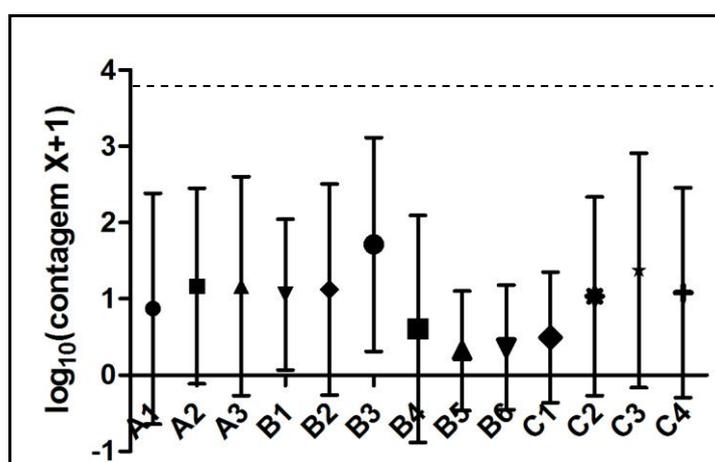


Figura 16 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de coliforme fecal no interior das amostras. A linha tracejada representa o limite máximo permitido para amostra indicativa (5×10^3 UFC/g)

As contagens de coliformes termotolerantes no interior de linguiças frescas de pernil suíno não sugerem diferença entre os mercados de acordo com sua qualificação na lista de verificação, como por exemplo A2, A3, B1, B2, C3 e C4; que foram qualificados com pontuações decrescentes.

Com relação aos agentes pesquisados, no presente trabalho sugere-se que estes resultados podem ser devido a uma abordagem amostral insuficiente ou a presença de outras variáveis importantes para detectar as diferenças, porém os valores demonstram a grande proximidade dos resultados, o que sugere falta de acompanhamento ou implantação de PPHO, PSO e BPF. Certamente os alimentos frescos possuem uma microbiota residente mista que pode vir a se desenvolver expressivamente de acordo com condições físicas e químicas propícias. Isto pode confirmar a importância da manutenção da cadeia de frio como principal fator determinante da qualidade higiênico sanitária de produtos de origem animal.

Não houve correlação entre a temperatura e as contagens tanto de *Staphylococcus* coagulase positiva quanto para coliformes fecais, fosse no interior ou na superfície. Diversos fatores podem ter influenciado nesse resultado, dentre os quais a quebra da cadeia de frio com oscilações na temperatura durante o período de estocagem (descongelamento e recongelamento) e contaminação excessiva da porção externa, dentre outros.

5.4.3 Confronto superficial com interior

Com o intuito de tornar possível a comparação entre os valores superficiais e internos, buscou-se calcular a relação entre área e peso amostral. A partir de oito pesagens de 10cm² de amostra diferentes de linguiça fresca de pernil suíno obteve-se a média 0,0875g±0,013. Com este dado foram transformados os valores superficiais de UFC/cm² em UFC/g com a fórmula:

$$1\text{cm}^2 = 0,00875\text{g} \rightarrow \text{fator de correção}$$

$$\mathbf{X = a/0,00875}$$
, onde:

X=valor em UFC/g

a=valor absoluto da contagem em UFC/cm²

Os valores de média e desvio padrão transformados e internos das amostras estão dispostos na tabela 5.

Tabela 5 Disposição dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e coliforme fecal no interior e superfície das amostras. As médias tanto superficial quanto do interior estão na mesma unidade. As letras maiúsculas seguidas de números correspondem aos estabelecimentos analisados.

Estabelecimento	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva		Coliforme fecal	
	Superficial	Interior	Superficial	Interior
A1	2,70±2,23 ^b	1,39±1,71 ^b	0,00±0,00 ^A	0,87±1,51 ^A
A2	3,37±1,76 ^b	2,72±1,33 ^b	0,00±0,00 ^A	1,17±1,28 ^A
A3	2,76±1,99 ^b	2,10±1,45 ^b	0,00±0,00 ^A	1,17±1,43 ^A
B1	2,99±1,50 ^b	1,02±1,04 ^c	0,00±0,00 ^A	1,06±0,99 ^A
B2	2,82±2,20 ^b	2,04±1,58 ^b	2,35±1,87 ^A	1,12±1,38 ^A
B3	3,72±1,82 ^b	2,61±1,40 ^b	0,00±0,00 ^A	1,71±1,40 ^A
B4	3,35±1,89 ^b	1,02±1,65 ^c	2,35±1,87 ^A	0,61±1,49 ^A
B5	3,85±2,31 ^b	2,06±1,06 ^b	0,53±1,29 ^A	0,32±0,78 ^A
B6	2,34±2,20 ^b	1,58±1,58 ^b	0,64±1,27 ^A	0,37±0,82 ^A
C1	3,96±1,98 ^b	1,96±1,92 ^b	0,82±1,41 ^A	0,49±0,86 ^A
C2	3,48±1,61 ^b	1,92±1,37 ^b	0,00±0,00 ^A	1,03±1,30 ^A
C3	3,27±2,29 ^b	2,30±1,72 ^b	0,71±1,75 ^A	1,37±1,54 ^A
C4	4,65±1,96 ^a	2,98±1,31 ^b	1,16±1,99 ^A	1,08±1,38 ^A

Valores acompanhados de letras diferentes ^{a, b, c, A} são estatisticamente distintos ($p < 0,05$)

Os dados de superfície e interior foram analisados quanto a variância e representaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Para *Staphylococcus* coagulase positiva, houve diferença apenas entre os valores internos de B1 e B4, e o superficial de C4. Estas contagens foram as menores e a maior média para o agente estudado. Referente às amostras superficiais, os mercados B3, B5, C1 e C4 conferiram médias superiores ao permitido pela legislação vigente, e todos os estabelecimentos conferiram ao menos uma contagem durante os experimento que excedia este limite; estando assim impróprias para o consumo humano, caso fosse considerado apenas esta porção da amostra.

Para coliformes fecais não foi encontrada distinção entre os valores de médias quando comparadas aos pares. Apenas os mercados B2, B4, C3 e C4 possuíram ao menos uma contagem superficial que superaram o limite máximo (5×10^3 UFC/g).

Com o intuito de melhor visualização da tabela mencionada, foram elaborados duas figuras 17 e 18 onde separou-se os agentes.

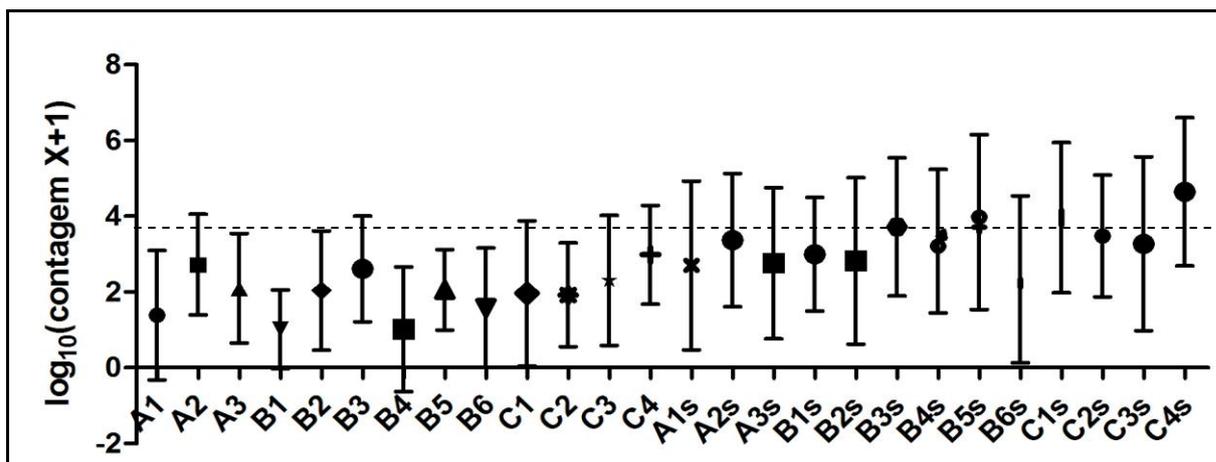


Figura 17 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva no interior e superfície das amostras. As amostras que contém a letra s representam as superficiais. A linha tracejada representa o limite máximo permitido para amostra indicativa (5×10^3 UFC/g). Os símbolos representam os valores de média de cada estabelecimento.

Na figura 17 observa-se uma tendência de maiores valores para as amostras superficiais com relação ao interior, com um certo acríve quanto mais a direita do gráfico os pontos se encontram. Isto pode ter como causa a pior qualificação dos estabelecimentos na Lista de Verificação promoveram melhores condições para a manutenção, desenvolvimento, e talvez, contaminação, de *Staphylococcus* coagulase positiva.

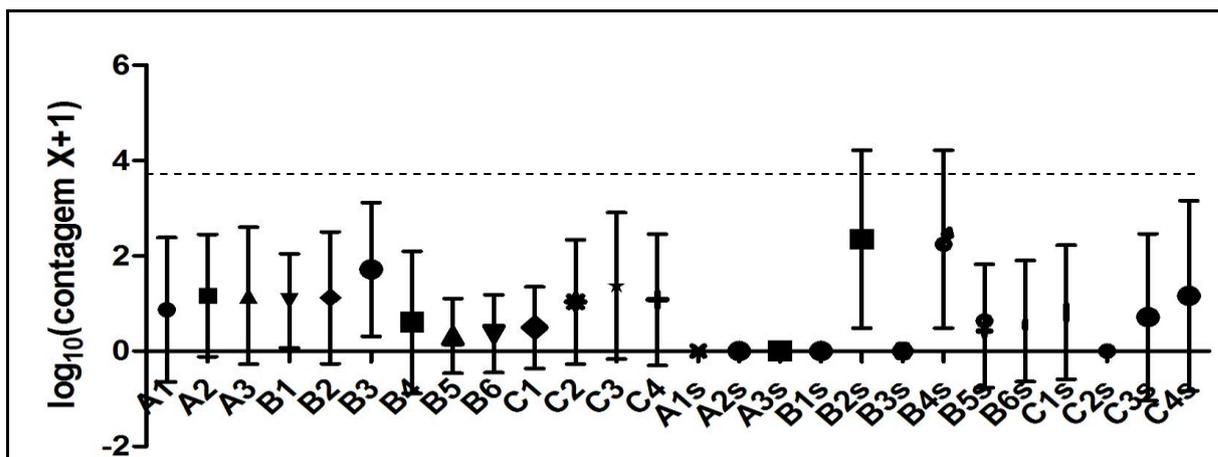


Figura 18 Disposição em gráfico dos valores de média em $\log(X+1)$ e desvio padrão das contagens de coliforme termotolerante no interior e superfície das amostras. As amostras que contém a letra s representam as superficiais. A linha tracejada representa o limite máximo permitido para amostra indicativa (5×10^3 UFC/g). Os símbolos representam os valores de média de cada estabelecimento.

Nesta figura 18 é possível observar que as amostras superficiais do grupo A, B1s, B3s e C2s obtiveram resultados negativos para o microrganismo em questão mesmo quando seu interior apresentava o agente. Este resultado poderia se dar pela contaminação durante a industrialização do produto, onde a cominuição, embutimento, fracionamento e adição de ingredientes e aditivos poderia promover a introdução de patógenos.

Diversos autores já discutiram sobre os parâmetro temperatura, pH e atividade de água exigido para o crescimento de *Staphylococcus aureus* e puderam constatar uma certa concordância quanto a temperatura: na faixa 8,0-19,0°C quando em pH próximo da neutralidade e alta atividade de água, como disposto no quadro 3 (BUCHANAN et al., 1993; CASTILLEJO-RODRÍGUEZ et al., 2002; INGHAM et al., 2007; LINDQVIST, 2006).

Quadro 1 Valores mínimos de temperatura, pH e atividade de água preditos onde $p < 0,01$ para *Staphylococcus aureus* (VALERO et al., 2009)

T (°C)	pH	Mínima atividade de água
8,00	6,50	0,974
10,00	6,00	0,937
13,00	5,50	0,913
16,00	5,00	0,906
19,00	4,50	0,907
T (°C)	Mínimo pH	Atividade de água
8,00	4,75	0,995
10,00	4,63	0,970
13,00	4,51	0,941
16,00	4,67	0,915
19,00	4,51	0,906
Mínima T (°C)	pH	Atividade de água
8,37	4,50	0,995
8,10	5,00	0,989
8,21	5,50	0,977
8,23	6,00	0,970
8,49	6,50	0,963

Valero et al.(2009) em seu estudo sobre modelagem do comportamento de *S.aureus* concluíram que em temperaturas inferiores a 8°C somente quando pH e atividade de água estivessem em seus pontos ótimo(>0,983 e 6,0-7,0; respectivamente), havia crescimento. Anteriormente, Vaz(2005) pesquisando sobre lingüiça de tilápia constatou valores próximos de 0,980. Ou seja, embutidos frescos possuem altos valores de atividade de água porém não na faixa ótima para o crescimento do agente em questão. Martins et al.(2007) observaram que as lingüiças frescas analisadas em seu estudo conferiram pH na faixa 5,23-6,78 o que possibilitaria o desenvolvimento dos patógenos estudados. Sendo assim, os resultados do presente trabalho demonstrou que o abuso na temperatura permitiu o desenvolvimento do patógeno.

Kamdem et al. (2007) analisando lingüiça toscana (Salciccia) observaram que os valores de *S.aureus* e coliformes não excederam 3 e 2 log UFC/g, respectivamente; o que também foi observado nesta pesquisa. O curto período de validade deste produto provavelmente foi estipulado tendo em vista a qualidade

inicial média do embutido, seu baixo padrão de controle interno de patógenos e esporulativos; e sua temperatura de estocagem.

Semelhante a *S.aureus*, os coliformes fecais também possuem exigências quanto ao pH($\leq 7,0$) e atividade de água($\geq 0,95$), o que os coloca na mesma posição quando observados os padrões físico-químicos de embutidos frescos(MOSSEL et al., 1995).

Isso mostra como este produto se situa na faixa de crescimento de *S.aureus* e coliformes fecais. Sendo assim, a variação dos desvios padrão com relação às suas médias está em conformidade com as temperaturas coletadas. Independentemente da qualificação do mercado, as amostras não possuíam culturas lácteas que garantissem a redução do pH e/ou produção de bacteriocinas que inibissem o desenvolvimento dos microrganismos nocivos, estando assim, apenas regido pela temperatura.

Em um estudo semelhante, onde foram analisados dois métodos de isolamento (suabe e destrutivo) para diferentes microrganismos em lombo suíno, Del-Serrone et al. (2006) obtiveram contagens de 1,3-4,3 log UFC/g para coliformes e 19% de frequência de *Salmonella* spp. Outro trabalho envolvendo diferente matriz alimentar obteve resultado semelhante, como Sachindra et al. (2005) estudando linguiça de búfalo, como contagens de *S.aureus* e coliformes, $1,57 \pm 0,11$ log UFC/g e 23,2 NMP/g, respectivamente. De fato, *Staphylococcus* spp. possui notoriamente o status de grande formador de biofilmes que o protege e fixa na superfícies, promovendo melhores condições para a transferência e contaminação(HARRIS et al., 2002).

No presente estudo não conseguiu-se diferenciar o grau de contaminação entre a porção interna e a superficial dentro de cada amostra. A transferência de células bacterianas seja entre superfícies biológicas ou abióticas segue um padrão ainda não muito elucidado. Diversos pesquisadores conseguiram determinar comportamentos que muitas vezes não era confirmado em outros estudos utilizando os mesmos padrões. Uma possível explicação para essa variação, é a presença de diferentes estirpes bacterianas dentro de uma mesma espécie. A maioria destes trabalhos analisaram colônias de células, sem elucidar o comportamento individual de cada estirpe, o que pode acabar mascarando comportamento peculiares. Mesmo assim, é de notório conhecimento alguns fatores que regem o comportamento destes microrganismos em diferentes materiais, como: hidrofobicidade(carga) da

parede bacteriana, estruturas(flagelos e fímbrias) da parede, propriedades do substrato e estágio de crescimento (BOWER et al., 1996; GOULTER et al., 2009; GOUNADAKI et al., 2008; KNOBBEN et al., 2007).

5.4.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Segundo disposto na RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA(BRASIL, 2001), deve haver ausência do agente em 25g da amostra analisada.

Das 93 amostras analisadas, 53% foram consideradas impróprias para o consumo humano, onde: oito (9%) apresentaram o agente em ambas as porções, dez(11%) apenas na face externa e 31(33%) apenas no interior, como mostra figura 19.

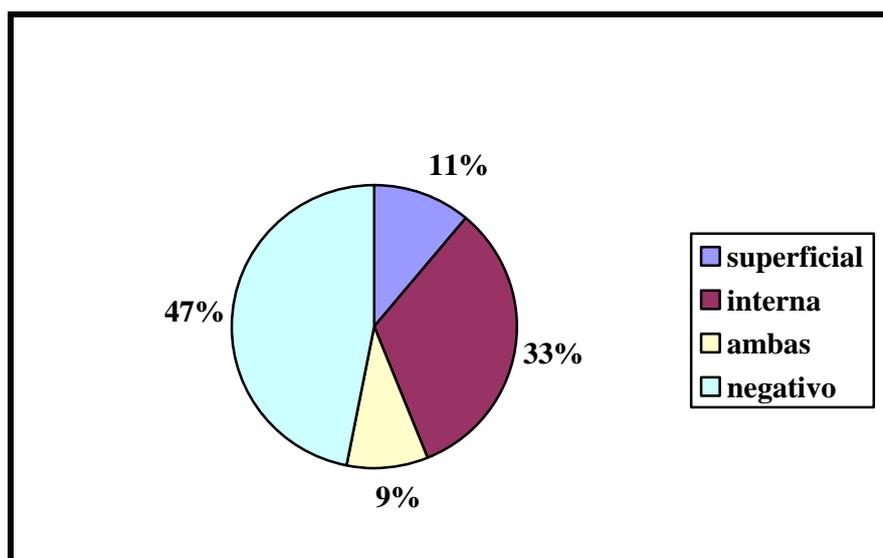


Figura 19 Disposição da prevalência de *Salmonella* spp. nas alíquotas superficial e interna de amostra de linguiça fresca suína

Analisando a combinação de meios utilizados nas etapas de enriquecimento seletivo e plaqueamento seletivo: RV-H, RV-BPLS, RV-Mc, SC-H, SC-BPLS e SC-Mc; foram analisados como tratamentos. O percentual de sucesso na confirmação sorológica a partir de tubo característico para *Salmonella* spp. em ágar TSI está demonstrado na tabela 5. Os dados encontrados no presente trabalho estão em desacordo com o descrito por Koyuncu e Haggblom (2009) sobre o desempenho de meios para o isolamento deste agente. Os autores citados concluíram que o ágar

BPLS não é um bom meio seletivo devido a altos níveis microbiota competidora e poucas colônias características de *Salmonella* spp.

Tabela 6 Disposição dos percentuais de confirmação sorológica a partir de comportamento característico para gênero *Salmonella* em ágar “Triple Sugar Iron”

	%superficial	%interior	%ambas
RV-H	29%	37%	35%
RV-BPLS	36%	44%	41%
RV-Mc	20%	22%	21%
RV	26%	33%	
SC-H	9%	25%	20%
SC-BPLS	20%	16%	17%
SC-Mc	17%	12%	14%
SC	14%	18%	

Na tabela 6 pode-se observar que tanto para alíquotas superficiais quanto internas a combinação RV-BPLS foi mais eficaz para detecção do agente estudado, seguido pela RV-H. As combinações que continham o caldo Selenito Cistina conferiram as piores chances de isolamento. Semelhante ao descrito por Boer (1998), houve melhor desempenho no RV em comparação ao SC; o pesquisador ressaltou ainda que a alta toxidez dos componentes do caldo SC pode levar a condições desfavoráveis para o crescimento do gênero em questão.

A frequência de isolamento de *Salmonella* spp. varia muito entre regiões de um mesmo país e entre países(ESCARTIN et al., 1999; MÜRMAN et al., 2008; SPRICIGO et al., 2008) chegando desde 12,8% no sul do Brasil a 88,3% no México.

A origem da contaminação interna possui grande variedade. Durante toda a cadeia produtiva é possível determinar pontos críticos que se distribuem desde a granja, passam pelo transporte, matadouro e industrialização(BERENDS et al., 1996; MATARAGAS et al., 2008; MICHAELS et al., 2004; SWANENBURG et al., 2001). A presença deste agente nas porções internas dos produtos industrializados pode se dar pelo contato direto com o conteúdo intestinal durante a linha de abate e processamento, ou ainda, devido ao estresse que debilita o sistema imune dos animais e possibilita o fluxo de enteropatógenos pelos tecidos.

A contaminação de superfícies por matérias-primas e posterior transferência de microrganismos para outros produtos é uma possível explicação para as dez amostras onde só foram positivos para alíquota externa. Isto entra em acordo com os itens observados na lista de verificação, onde os principais pontos de não

conformidade foram: excesso de resíduos na bancada e falta de higienização regular dos colaboradores. A partir destes dados conclui-se que a contaminação cruzada entre produtos e entre produtos-mãos-superfícies põe em risco a saúde do consumidor (KNOBBEN et al., 2007; KUSUMANINGRUM et al., 2003; SHOJAEI et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que:

- Todos mercados se encontraram fora do padrão exigido para temperatura de resfriamento do ponto de comercialização;
- O padrão bacteriológico para *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes dos produtos estava dentro dos padrões preconizados;
- Não foi possível traçar uma relação entre contaminação superficial e pontos visuais de qualificação higiênico-sanitária;
- Não houve diferença entre contaminação na superfície ou no interior na maioria dos mercados analisados independentemente de sua graduação;
- A lista de verificação não se mostrou capaz de exercer a função exigida;
- A combinação de meios Rappaport-Vassiliadis / BPLS conferiu os melhores percentuais de isolamento de *Salmonella* spp.
- Este tipo de produto confere risco a saúde do consumidor devido a expressiva presença de *Salmonella* spp.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSIADIS, J; SOULTOS, N; ABRAHIM, A; BLOUKAS, J.G. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. *Meat Science*. v.66, n. 2, p.279-287. 2004.

ATANASSOVA, V; MEINDL, A; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooker smoked ham- a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*. v.68, n. 1-2, p.105-113. 2001.

BALADAN, N; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*. v.61, n.1, p.1-10. 2000.

BERENDS, B.R.; URLINGS, H.A.P.; SNIJERS, J.M.A.; VAN KNAPEN, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. *International Journal of Food Microbiology*. v.30, n.1-2, p.37-53, 1996.

BOER, E. Update on media for isolation of Enterobacteriaceae from foods. *International Journal of Food Microbiology*. v.45, n.1, p.43-53. 1998.

BOWER, C.K; McGUIRE, J; DAESCHEL, M.A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends on Food Science & Technology*. v.7, n.5, p. 152-157. 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº4, de 31 de março de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 6, 05 abr. 2000. Seção 1.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p. 14, 18 set. 2003. Seção 1.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.004, de 11 de dezembro de 1998. Aprovar o Regulamento Técnico: “Atribuição de Função de Aditivos, Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos”. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.28, 14 dez. 1998. Seção 1.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimento Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1.

_____. Secretaria Municipal de Saúde do Município de São Paulo. Portaria nº1.210, de 03 de agosto de 2006. Aprova o regulamento técnico de Boas Práticas e estabelece critérios e procedimentos operacionais padronizados para produção de alimentos. *Diário Oficial [do] Município de São Paulo*, São Paulo, SP, p. 21. 03 ago. 2006.

BUCHANAN, R.L.; SMITH, J.L.; MCCOLGAN, C.; MARMER, B.S.; GOLDEN, M.; DELL, B. Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *Journal of Food Safety*. v.13, n.3, p. 159–175. 1993.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, M.B.M; CAMPOS, L.C; GOMPertz, O.F; RÁCZ, M.L. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p., cap.43, p.319-328.

CASTILLEJO-RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZURERA-COSANO, G.; BARCO-ALCALÁ, E.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, R. Assessment of mathematical models for predicting *Staphylococcus aureus* growth in cooked meat products. *Journal of Food Protection*. v. 65, n.4, p. 659–665. 2002.

CDC, 2010. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella serotype Enteritidis*. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmoneilla_enteritidis/>. Acessado em 01 de dez 2010.

CHAVES, G.M.C.; GOLÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P. Avaliação bacteriológica de linguiça fresca suína comercializada no município do Rio de Janeiro, RJ. *Higiene Alimentar*, São Paulo: DPI Studio e Editora Ltda, v. 14, n. 73, p. 48-52, jun. 2000.

CHEVALLIER, I.; AMMOR, S.; LAGUET, A.; LABAYLE, S.; CASTANET, V.; DUFOUR, E.; TALON, R. Microbial ecology of a small-scale facility producing traditional dry sausage. *Food Control*, v. 17, n. 6, p. 446-453, jun. 2006.

COCOLIN, L.; RANTSIOU, K.; IACUMIN, L.; URSO, R.; CANTONI, C.; COMI, G. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. v.70, n.4, p.1883-1894, abr. 2004

COIA, J.E.; JOHNSTON, Y.; STEERS, N.J.; HANDSON, M.F. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw milk cheeses in south-east Scotland. *International Journal of Food Microbiology*. v.66, n.1-2, p.63-69. 2001.

COSTALUNGA, S.; TONTO, E. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 33, n.4, p.342-346. 2002

DEL SERRONE, P.; CONTILLO, R.; FAILLA, S.; DELLA CASA, G.; LANNI, L.; SACCANI, G.; SACCARES, S. Assessment of the microbiological quality of retail fresh pork meat in central Italy. *Italian Journal of Food Science*. v.18, n.4, p.397-408. 2006.

DELHALLE, L.; SAEGERMAN, C.; FARNIR, F.; KORSAK, N.; MAES, D.; MESSENS, W.; SADELEER, L.; ZUTTER, L.; DAUBE, G. *Salmonella* surveillance and control at post-harvest in the Belgian pork meat chain. *Food Microbiology*. v.26, n.3, p.265-271. 2009

DOYLE, M.P. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *International Journal of Food Microbiology*. v. 12, n.4, p.289-302. 1991

EISEL, W.G.; LINTON, R.H.; MURIANA, P.M. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a red meat processing plant. *Food Microbiology*. v.14, n.3, p.273-282. 1997

ERICKSON, M.C.; DOYLE, M.P. Food as vehicle for transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*. v.70, n.10. 2007

ESCARTIN, E.F.; CASTILLO, A.; HINOJOSA-PUGA, A.; SALDAÑA-LOZANO, J. Prevalence of *Salmonella* in chorizo and its survival under different storage temperatures. *Food Microbiology*. v.16, n.5, p.479-486, 1999.

GARRIDO, V.; GARCIA-JALON, I.; VITAS, A.I.; SANAA, M. Listeriosis risk assessment: Simulation modelling and "what if" scenarios applied to consumption of ready-to-eat products in a Spanish population. *Food Control*. v.21, n.3, p.231-239. 2010.

GILL, C.O.; FRISKE, M.; TONG, A.K.W.; MCGINNIS, J.C. Assessment of the hygienic characteristics of a process for the distribution of processed meats, and of storage conditions at retail outlets. *Food Research International*. v.28, n.2, p.131-138. 1995

GILL, C.O.; MCGINNIS, J.C. Microbiological conditions of air knives before and after maintenance at a beef packing plant. *Meat Science*. v.68, n.2, p.333-337. 2004.

GONZÁLEZ-MONTALVO, B.; CAPITA, R.; GUEVARA-FRANCO, J.; PRIETO, M.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of oxygen exclusion and temperature on pathogenic bacteria levels and sensory characteristics of packed ostrich steaks throughout refrigerated storage. *Meat Science*. v.76, n.2, p.201-209. 2007.

GOULTER, R.M.; GENTLE, I.R.; DYKES, G.A. Issues in determining factors influencing bacterial attachment: a review using the attachment of *Escherichia coli* to abiotic surfaces as an example. *Letters in Applied Microbiology*. v.49, n.1, p.1-7. 2009.

GOUNADAKI, A.S.; SKANDAMIS, P.N.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.J.E. Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiology*. v.25, n.2, p.313-323. 2008.

GREIG, J.D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology*. v.130, n.2, p.77-87. 2009.

HARRIS, L.G.; FOSTER, S.J.; RICHARDS, R.G. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S.aureus* adhesions in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells and Materials*. v.4, n.1, p.39-60. 2002.

HENSON, S.J.; MAJOWICS, S.E.; MASAKURE, O.; SOCKETT, P.N.; MACDOUGALL, L.; EDGE, V.L.; THOMAS, M.K.; FYFE, M.; KOVACS, S.J.; JONES, A.Q. Estimation of the cost of acute gastrointestinal illness in British Columbia, Canada. *International Journal of Food Microbiology*. v.127, n.1-2, p.43-52. 2008.

INGHAM, S.C.; FANSLAU, M.A.; BURNHAM, G.M.; INGHAM, B.H.; NORBACK, J.P.; SCHAFFNER, D.W. Predicting pathogen growth during short-term temperature abuse of raw pork, beef, and poultry products: use of an isothermal-based predictive tool. *Journal of Food Protection*. v. 70, n.6, p. 1445–1456. 2007.

IPEM-SP. Instituto de Pesos e Medidas do Estado de São Paulo. *Consumidor corre risco com falta de controle das temperaturas dos balcões dos supermercados*. Disponível em: <<http://www.ipem.sp.gov.br/6ai/2010/rel10-3.asp?vpro=frio>> . Acessado em 10 de jan de 2011. 2010.

JOL, S.; KASSIANENKO, A.; WSZOL, K.; OGGEL, J. The cold chain, one link in Canada`s food safety initiatives. *Food Control*. v.18, n.6, p.713-715. 2007.

JOSHI, R.; BANWET, D.K.; SHANKAR, R. Consumer link in cold chain: Indian scenario. *Food Control*. v.21, n.8, p.1137-1142. 2010.

KAMDEM, S.S.; PATRIGNANI, F.; GUERZONI, M.E. Shelf-life and safety characteristics of Italian Toscana traditional fresh sausage(Salsiccia) combining two commercial ready-to-eat additives and spices. *Food Control*. v.18, n.5, p.421-429. 2007.

KANDEEPAN, G.; ANJANEYULU, A.S.R.; KONDAUAH, N.; MENDIRATTA, S.K. Quality of buffalo meat keema at different storage temperature. *African Journal of Food Science*. v.4, n.6, p.410-417. 2010.

KNOBBEN, B.A.S.; MEI, H.C.; HORN, J.R.; BUSSCHER, H.J. Transfer of bacteria between biomaterials surfaces in the operating room – An experimental study. *Journal of Biomedical Materials Research*. v. 80, n.4, p.790-799, 2007.

KOYUNCU, S.; HAGGBLOM, P. A comparative study of cultural methods for the detection of *Salmonella* in feed and feed ingredients. *BMC Veterinary Research*. v.5, n.6, 10p., 2009.

KUSUMANINGRUM, H.D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W.C.; BEUMER, R.R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. v.85, n.3, p.227-236, 2003.

LECLERC, H.; MOSSEL, D.A.A.; EDBERG, S.C.; STRUIJK, C.B. Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. *Annual Review of Microbiology*. v.55, n.1, p.201-234. 2001.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluste of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*. v.95, n.1, p.38-43. 2003.

LINDQVIST, R. Estimation of *Staphylococcus aureus* growth parameters from turbidity data: characterization of strain variation and comparison of methods. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 72, n.7, p. 4862–4870. 2006.

LOPALCO, P.L.; GERMINARIO, C.; DI MARTINO, V.; FRISOLI, L.; PAGANO, A.; QUARTO, M.; BARBUTI, S. Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic. *Annali di Igiene*. v.12, n.4, p. 279-285. 2000.

LYNCH, M.; PAINTER, J.; WOODRUFF, R.; BRADEN, C.; CDC. Surveillance for foodborne-disease outbreaks—United States, 1998-2002. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*. v.55, n.10, p.1-42.2006.

MARTINS, T.D.D.; BEZERRA, W.I.; BATISTA, E.S.; SANTOS, J.G.; ARRUDA, J.C.B.; SILVA, L.P.G.; PEREIRA, W.E. Valores de pH e cor da linguiça mista frescal comercializada em Solânea-PB, Brasil. In: II Jornada Nacional da Agroindústria ,*Anais..*, Bananeiras, PB, Brasil, 2007.

MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.N.; DROSINOS, E.H. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations. *International Journal of Food Microbiology*. v. 126, n.1-2, p.1-12. 2008

MATEUS, P. Sausage processing: An ancient art. *Meat Processing*. v.4, n.2, p.12-13. 1997.

MICHAELS, B.; KELLER, C.; BLEVINS, M.; PAOLI, M.; RUTHMAN, T.; TODD, E.; GRIFFITH, C.J. Prevention of food worker transmission of food borne pathogens: risk

assessment and evaluation of effective hygiene intervention strategies. *Food Service Technology*. v.4, n.1, p.31-49, 2004.

MOSSEL, D.A.A.; CORRY, J.E.L.; STRUIJK, C.B.; BAIRD, R.M. The control of microbial safety and quality of foods. In: *Essentials of the microbiology of foods. A textbook for advanced studies*. p.287-296. 1995. 695p.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M.S.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. *Food Control*. v.20, n. 3, p.191-195. 2009

OLSEN, S.J.; MACKINNON, L.C.; GOULDING, J.S.; BEAN, N.H.; SLUTSKER, L. Surveillance for foodborne - disease outbreaks—United States, 1993-1997. *Mortality Weekly Report Surveillance Summaries*. v.49, n.1, p.1-62.2000

PAKALNISKIENE, J.; FALKENHORST, G.; LISBY, M.; MADSEN, S.B.; OLSEN, K.E.P.; NIELSEN, E.M.; MYGH, A.; BOEL, J.; MØLBAK, A. A foodborne outbreak of enterotoxigenic *E.coli* and *Salmonella* Anatum infection after a high-school dinner in Denmark, November 2006. *Epidemiology and Infection*. v.137, n. 3, p.396-401. 2009.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; VALERO, A; CARRASCO, E.; GARCÍA,R.M.; ZURERA, G. Understanding and modelling bacterial transfer to foods:a review. *Trends in Food Science & Technology*. v.19, n.3, p.131-144. 2008.

PHILLIP, S.; ANITA, E. Efficacy of the theory of planned behavior model in predicting safe food handling practices. *Food Control*. v.21, n.7, p.983-987. 2010.

PINTAR, K.; COOK, A.; POLLARI, F.; RAVEL, A.; LEE, S.; ODUMERU, J.J. Quantitative effect of refrigerated storage time on the enumeration of *Campylobacter*, *Listeria*, and *Salmonella* on artificial inoculated raw chicken meat. *Journal of Food Protection*. v.70, n.3, p.739-743. 2007.

RIVAS, L.; FEGAN, N.; DYKES, G.A. Attachment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. v.115, n.1, p.89-94. 2007.

RONCALES, P.; AGUILERA, M.; BELTRAN, J.A.; JAIME, I.; PEIRO, J.M. The effect of natural or artificial casing on the ripening and sensory quality of a mould-covered dry sausage. *International Journal of Food Science & Techonology*. v.26, n.1, p.83-89. 1991.

SACHINDRA, N.M.; SAKHARE, P.Z.; YASHODA, K.P.; NARASIMHA RAO, D. Microbioal profile of buffalo sausage during processing and storage. *Food Control*. v.16, n.1, p.31-35. 2005.

SORIANO, J.M.; BLESA, J.; RICO, H.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. Incidence of *Staphylococcus aureus* in meals from cafeterias. *Journal of Food Safety*. v.22, n.2, p. 135-140. 2002.

SPRICIGO, D.A.; MATSUMOTO, S.R.; ESPÍNDOLA, M.L.; VAZ, E.K.; FERRAZ, S.M. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos se sorovares de *Salmonella* isolados de linguiças suínas tipo frescal em Lages, SC. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.60, n.2, p.517-520. 2008

SHOJAEI, H.; SHOOSHTARIPOOR, J.; AMIRI, M. Efficacy of simple hand-washing in reduction of microbial hand contamination of Iranian food handlers. *Food Research International*. v.39, n.5, p.525-529. 2006.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.; SNIJDERS, J.M.; KEUZENKAMP, D.A.; van KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *International Journal of Food Microbiology*. v.70, n. 3, p.243-254. 2001

TAUXE, R.V. Emerging Foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*. v.78, n.1-2, p.31-41. 2002.

TERRA, N.N. *Apostamentos de Tecnologia de Carnes*. São Leopoldo: Unisinos, 1998. 216p.

TSEN, H.Y.; HU, H.H.; LIN, J.S.; HUANG, C.H.; WANG, T.K. Analysis of *Salmonella typhimurium* isolates from food-poisoning cases by molecular subtyping methods. *Food Microbiology*. v.17, n. 2, p.143-152. 2000.

VALERO, A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CARRASCO, E.; FUENTES-ALVENTOSA, J.M.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZURERA, G. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology*. v.133, n.1-2, p.186-194. 2009.

VAZ, S.K. *Elaboração e caracterização de linguiça frescao "tipo toscana" de tilápia (*Oreochromis niloticus*)*. CURITIBA. 97p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia da Univesidade Federal do Paraná, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

WHO. Guidelines for drinking water quality. *Health Criteria and Other Sippoing Information*. v.2, p.82-106. 1996.

ZAMBONELLI, C.; PAPA, F.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; GRAZIA, L. *Microbiologia dei salumi*. Italia: Il Sole 24 Ore Edagricole, 1992. 268p.

ZERAIK, A.E.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as agents to reduce adhesion of pathogenic bacteria to polystyrene surfaces: Effect of temperature and hydrophobicity. *Current Microbiology* v.61, n.6, p.554-559. 2010.

8 APÊNDICE

8.1 LISTA DE VERIFICAÇÃO

NÚMERO DO ESTABELECIMENTO: _____ DATA: _____

ENDEREÇO (Rua/Av.): _____

BAIRRO: _____

MARCAS OFERECIDAS: _____

1 EDIFICAÇÃO, INSTALAÇÕES, EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS	C	NC	NA
1.1 Acesso às instalações é controlado e independente			
1.2 Existência de separação entre as diferentes atividades			
1.3 Piso, parede e teto de revestimento liso impermeável e lavável			
1.3.1 Íntegros, conservados, sem rachaduras, trincas, goteiras, vazamentos, infiltrações, bolores, descascamentos			
1.4 Portas e janelas ajustadas aos batentes			
1.4.1 Portas com fechamento automático			
1.4.2 Janelas com tela milimetrada			
1.5 Presença de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente			
1.6 Presença de animais			
1.7 Iluminação eficiente e com proteção contra contaminação física			
1.8 Instalações elétricas embutidas ou protegidas por tubulação			
1.9 Ventilação garante a renovação de ar			
1.9.1 Incide diretamente sobre os alimentos			
1.10 Instalações sanitárias e vestiários sem comunicação direta com a área de manipulação			
1.11 Presença de coletores de resíduos(lixeiras)			
1.11.1 Tampadas durante a observação			
1.11.2 Acima de sua capacidade(remoção frequente)			
1.11.3 Com acionamento sem contato manual			
1.12 Existência de lavatórios na área de manipulação			
1.12.1 Instrução para correta higienização das mãos			
1.12.2 Sabonete líquido inodoro			
1.12.3 Papel não reciclado ou outro sistema de secagem eficiente			
1.13 Equipamentos, móveis e utensílios de material apropriado			
1.13.1 Em bom estado de conservação			
2 HIGIENIZAÇÃO DE INSTALAÇÕES, EQUIP., MÓVEIS E UTENSÍLIOS			
2.1 Condição higiênico-sanitárias apropriadas			
2.2 Utensílios utilizados na higienização próprios e exclusivos para a atividade			
3 CONTROLE DE VETORES E PRAGAS URBANAS			
3.1 Presença de vetores ou pragas			
3.2 Presença de armadilhas/dispositivos para controle			
4 MANIPULADORES			
4.1 Livres de lesões ou sintomas de enfermidade			
4.2 Asseio pessoal (uniformes limpos)			
4.2.1 Barbeados			
4.2.2 Unhas limpas, cortadas e sem esmalte			
4.3 Realizam correta higienização das mãos			
4.4 Fumam, falam desnecessariamente, cantam, tosem, espirram, assobiam, comem, manipulam dinheiro (QUAL)			
4.5 Cabelos presos e protegidos por rede/touca			
4.6 Portam anéis, pulseiras, relógio, colar, maquiagem			

C-Conforme NC-Não conforme NA-Não aplicável

Tabela 1 Disposição dos pontos de não conformidade e seus percentuais com relação ao total observado em cada grupo

1 EDIFICAÇÃO, INSTALAÇÕES, EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS	A	B	C	TOTAL
1.1 Acesso às instalações é controlado e independente			3(2,80%)	3
1.2 Existência de separação entre as diferentes atividades			2(1,87%)	2
1.3 Piso, parede e teto de revestimento liso impermeável e lavável			2(1,87%)	2
1.3.1 Íntegros, conservados, sem rachaduras, trincas, goteiras, vazamentos, infiltrações, bolores, descascamentos		2(3,08%)	4(3,74%)	6
1.4 Portas e janelas ajustadas aos batentes		1(1,54%)	3(2,80%)	4
1.4.1 Portas com fechamento automático		1(1,54%)	4(3,74%)	5
1.4.2 Janelas com tela milimetrada				
1.5 Presença de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente	2(7,14%)	2(3,08%)	4(3,74%)	8
1.6 Presença de animais		1(1,54%)	2(1,87%)	3
1.7 Iluminação eficiente e com proteção contra contaminação física	1(3,57%)	3(4,62%)	5(4,67%)	9
1.8 Instalações elétricas embutidas ou protegidas por tubulação		1(1,54%)		1
1.9 Ventilação garante a renovação de ar	3(10,71%)	4(6,15%)	5(4,67%)	12
1.9.1 Incide diretamente sobre os alimentos			2(1,87%)	2
1.10 Instalações sanitárias e vestiários sem comunicação direta com a área de manipulação				
1.11 Presença de coletores de resíduos(lixeiros)	1(3,57%)	2(3,08%)	2(1,87%)	5
1.11.1 Tampadas durante a observação	1(3,57%)	4(6,15%)	4(3,74%)	9
1.11.2 Acima de sua capacidade(remoção frequente)		3(4,62%)	1(0,93%)	4
1.11.3 Com acionamento sem contato manual	1(3,57%)	4(6,15%)	4(3,74%)	9
1.12 Existência de lavatórios na área de manipulação	1(3,57%)	1(1,54%)	3(2,80%)	5
1.12.1 Instrução para correta higienização das mãos	3(10,71%)	5(7,69%)	5(4,67%)	13
1.12.2 Sabonete líquido indoor	1(3,57%)	5(7,69%)	5(4,67%)	11
1.12.3 Papel não reciclado ou outro sistema de secagem eficiente	2(7,14%)	5(7,69%)	5(4,67%)	12
1.13 Equipamentos, móveis e utensílios de material apropriado		1(1,54%)		1
1.13.1 Em bom estado de conservação		1(1,54%)	4(3,74%)	5
2 HIGIENIZAÇÃO DE INSTALAÇÕES, EQUIP., MÓVEIS E UTENSÍLIOS				
2.1 Condição higiênico-sanitárias apropriadas	1(3,57%)	3(4,62%)	5(4,67%)	9
2.2 Utensílios utilizados na higienização próprios e exclusivos para a atividade	2(7,14%)	4(6,15%)	5(4,67%)	11
3 CONTROLE DE VETORES E PRAGAS URBANAS				
3.1 Presença de vetores ou pragas	1(3,57%)	3(4,62%)	5(4,67%)	9
3.2 Presença de armadilhas/dispositivos para controle	3(10,71%)		4(3,74%)	7
4 MANIPULADORES				
4.1 Livres de lesões ou sintomas de enfermidade				
4.2 Asseio pessoal (uniformes limpos)			1(0,93%)	1
4.2.1 Barbeados		3(4,62%)	5(4,67%)	8
4.2.2 Unhas limpas, cortadas e sem esmalte			2(1,87%)	2
4.3 Realizam correta higienização das mãos	3(10,71%)	3(4,62%)	3(2,80%)	9
4.4 Fumam, falam desnecessariamente, cantam, tosem, espirram, assobiam, comem, manipulam dinheiro	1(3,57%)	2(3,08%)	1(0,93%)	4
4.5 Cabelos presos e protegidos por rede/touca			5(4,67%)	5
4.6 Portam anéis, pulseiras, relógio, colar, maquiagem	1(3,57%)	1(1,54%)	2(1,87%)	4
TOTAL	28(100%)	65(100%)	107(100%)	200