



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA**

STEPHANIE RAMOS FRANCA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LINGUIÇAS DE FRANGO DO TIPO
FRESCAL COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA, DF

2018

STEPHANIE RAMOS FRANCA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LINGUIÇAS DE FRANGO DO TIPO
FRESAL COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF

2018

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F ST827q Franca, Stephanie Ramos
Qualidade microbiológica de linguiças de frango do tipo
frescal comercializadas em supermercados do Distrito
Federal. / Stephanie Ramos Franca; orientador Daniela
Castilho Orsi; co-orientador Izabel Cristina Rodrigues da
Silva. -- Brasília, 2018.
41 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2018.

1. Qualidade microbiológica. 2. Contaminação de alimentos.
3. Linguiça Frescal. 4. Linguiça de Frango. I. Orsi, Daniela
Castilho, orient. II. Silva, Izabel Cristina Rodrigues da ,
co-orient. III. Título.

STEPHANIE RAMOS FRANCA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE LINGUIÇAS DE FRANGO DO TIPO
FRESAL COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Msc. Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF

2018

Agradecimentos

Primeiramente à Deus tornou possível a realização deste sonho, e tem me dado saúde, força e sabedoria ao longo de minha vida, e que não somente nestes anos como universitária, mas em todos os momentos me guiou para que eu chegasse até aqui.

À Instituição Universidade de Brasília, mais especificamente à Faculdade de Ceilândia, pela oportunidade oferecida, pelo conhecimento construído, pelos seus excelentes profissionais com quem eu tive o prazer de conviver ao longo desses anos, e claro pela vivência, experiências e pelas amizades construídas dentro de seus muros.

À minha orientadora Dra. Daniela Orsi, pelas suas correções e incentivos. Sou grata pelo desprendimento e empenho que foi dado a mim, de graça, abrindo mão até mesmo de suas férias para que este trabalho fosse possível, dando atenção, todo o suporte necessário e me ensinando tudo que eu precisava saber para executar este projeto. Muito obrigada por sua atenção, dedicação e cuidado ao me ensinar!

À minha co-orientadora Dra. Izabel Cristina, pela paciência em me passar do zero os conhecimentos práticos e teóricos que eu ainda não havia adquirido, e por ter feito isso durante suas férias, mesmo com tantos outros assuntos que demandavam sua atenção.

Ao meu namorado Rodrigo, que teve paciência, cuidou do Miguel (nosso filho) em momentos que eu não pude cuidar, e me disse que eu conseguiria, mesmo nos momentos que eu mesma duvidava disso.

Ao meu filho Miguel, não tenho palavras para agradecer por todo amor e força que vieram através de seus sorrisos, seus abraços, beijinhos babados, seus primeiros passinhos e até mesmo seus choros. Você me deu forças e me fez lembrar cada dia o motivo de todo esforço feito ao longo deste ano. TUDO é por você!

À minha família que dedicou todo amor, incentivo, apoio incondicional, não somente a mim, mas ao Miguel, cuidaram dele durante todo o tempo que precisei estar fora de casa, seja no estágio, no laboratório ou no trabalho. À minha mãe agradeço por ser a mulher mais guerreira e amorosa que conheço, você foi a vovó maravilha durante os últimos 12 meses, para que eu pudesse concluir a graduação.

Durante esse tempo você não carregou apenas os 10Kg do Miguel, mas carregou 10 toneladas de amor, sem você eu teria desistido antes mesmo de tentar. Ao meu pai sou grata por ter sido minha razão e me incentivar dia a dia a percorrer meus objetivos e ser uma mulher independente. À minha irmã um agradecimento especial, pois sem ela sequer teria feito o vestibular, você sabe a luta que foi me tirar de casa para ir fazer a prova naquele dia, quando achei que não teria chance nenhuma de entrar nesta universidade. Vocês são sensacionais, não existem palavras para agradecer.

Agradeço aos meus amigos, companheiros de trabalhos, almoços. A amizade de vocês me ajudou a perseverar durante esta jornada que fizemos juntos. Mesmo que a vida adulta nos separe as vezes, vocês vão continuar presentes em minha vida com certeza.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A linguiça frescal é um dos embutidos cárneos mais consumidos pelos brasileiros e o aumento da produção e do consumo deste alimento chama a atenção para a segurança do mesmo. Assim, este trabalho apresenta a avaliação da qualidade microbiológica de amostras de linguiça de frango frescal comercializadas no Distrito Federal. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicrotóficas, determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. e também identificação molecular de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*. Os resultados do estudo mostraram que das oito amostras de linguiça de frango analisadas, três amostras (37,5%) estavam impróprias para o consumo pelo excesso de bactérias *S. aureus*. E a região gênica *Nuc* identificada através de PCR indicou que as bactérias *S. aureus* provenientes dessas amostras de linguiças de frango eram produtoras de enterotoxinas. A amostra 2 que já havia sido reprovada pelo excesso de bactérias *S. aureus*, também apresentou *Salmonella* spp. (confirmada geneticamente através da presença do gene *invA*). Com relação à qualidade higiênicossanitária, duas amostras deste estudo (amostras 7 e 8) apresentaram elevada contagem de microrganismos mesófilos de 7,27 e 7,18 log UFC/g, respectivamente. Essa quantidade elevada de microrganismos mesófilos, além de reduzir o tempo de prateleira desses produtos, também indica falta de higiene na manipulação durante o processo produtivo. A amostra 7 também apresentou condições insatisfatórias de higiene pelo elevado número de coliformes totais (3,04 log NMP/g). Apesar do baixo número de coliformes termotolerantes, a presença de *E. coli* foi detectada em quatro amostras de linguiças pela técnica de PCR. Os resultados obtidos revelam que o excesso de manipulação da linguiça frescal reduz a sua qualidade microbiológica, podendo torná-la um veículo para transmissão de *S. aureus* patogênica produtora de enterotoxinas.

Palavras chave: linguiça frescal, linguiça de frango; qualidade microbiológica; contaminação de alimentos.

ABSTRACT

Fresh sausage is one of the most consumed meat foods for Brazilians and increasing the production and consumption of this food draws attention to the safety of it. Thus, this work presents the evaluation of the microbiological quality of fresh chicken sausage sold in the Federal District. The analyzes were: total counting of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total coliforms and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* count, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. research and also molecular identification of *E. coli*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*. The results of the study showed that of the eight chicken sausage samples analyzed, three samples (37.5%) were unfit for consumption by excess of *S. aureus* bacteria. And the gene *Nuc* region identified by PCR indicated that the *S. aureus* bacteria from the chicken sausage samples were enterotoxin producers. Sample 2, which had already been rejected by the excess of *S. aureus* bacteria, also presented *Salmonella* spp. (genetically confirmed by the presence of the *invA* gene). Regarding sanitary hygienic quality, two samples from this study (samples 7 and 8) presented high counts of mesophilic microorganisms of 7.27 and 7.18 log CFU / g, respectively. Sample 7 also presented unsatisfactory hygiene conditions due to the high number of total coliforms (3.04 log NMP / g). Despite the low number of thermotolerant coliforms, the presence of *E. coli* was detected in four samples of sausages by the PCR technique. The results show that the excess handling of fresh sausage reduces its microbiological quality and can make it a vehicle for the transmission of pathogenic enterotoxin-producing *S. aureus*.

Palavras chave: fresh sausage, chicken sausage, microbiological quality, food contamination.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Produção de linguiças do tipo frescal.....	9
1.2. Qualidade microbiológica de linguiças do tipo frescal.....	11
1.3. Doenças transmitidas por alimentos.....	12
1.4. Microrganismos de interesse em alimentos.....	13
1.5. Uso da biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos	15
2. OBJETIVOS.....	17
3. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR.....	18
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	32
5. ANEXO 1	36
LISTA DE FIGURAS	36
6. ANEXO 2	37
FOTOS PCR.....	37
6. ANEXO 3	40
FOTOS PLACAS	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes <i>Nuc</i>, <i>invA</i> e <i>MalB</i>.....	22
Tabela 2. Análises microbiológicas das amostras de linguiça de frango frescal.....	24
Tabela 3. Análises moleculares das amostras de linguiça de frango frescal.....	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. Produção de linguiças do tipo frescal

Segundo a definição do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) entende-se por produto cárneo embutido, aquele que é produzido com carne ou órgãos comestíveis, curado ou não, condimentado, que pode ser ou não cozido, defumado ou dessecado, e deve estar contido em envoltório natural ou artificial (BRASIL, 2017). O mercado de embutidos tem apresentado significativa expansão nas últimas décadas, uma vez que o seu consumo se tornou parte do hábito alimentar de uma parcela considerável de consumidores brasileiros. Dentre os embutidos, a linguiça frescal é um dos mais consumidos devido a seu processamento relativamente simples e preço acessível (ALBERTI e NAVA, 2014; NASCIMENTO et al., 2012; ZINNAU, 2011).

As matérias primas mais utilizadas na produção de linguiças são as carnes de frango e de porco. As carnes de frango ocupam o segundo lugar em consumo no país e as carnes de porco o terceiro, correspondendo a 35,4 kg e 11,3 kg por pessoa, respectivamente, sendo que aproximadamente 70% dessas carnes são comercializadas na forma de embutidos, principalmente como linguiças. Por ser um produto bem aceito e extensamente comercializado, a frequência no consumo deste embutido chama a atenção para segurança do alimento (GEORGES, 2015; SOUZA et al., 2014; RALL et al, 2009).

A produção da linguiça frescal pode ocorrer em estabelecimentos de pequeno, médio e grande porte (OLIVEIRA et al., 2005). As linguiças do tipo frescal, não são submetidas ao cozimento. As características físico-químicas desse alimento devem ser: umidade máxima de 70%, gordura máxima de 30% e quantidade mínima de proteína de 12% (BRASIL, 2000).

A elaboração da linguiça frescal inclui as fases de preparo da carne, moagem, mistura (onde ocorre à adição de ingredientes, como condimentos e aditivos), embutimento, embalagem e estocagem. Como matérias-primas podem ser utilizadas carnes de suínos, bovinos e aves, assim como retalhos de carne gorda ou magra e toucinho. O tipo de carne a ser empregado varia de acordo com a formulação escolhida. As carnes usadas para a fabricação de linguiça são resfriadas (não

congeladas) e limpas, sendo retirados os nervos, cartilagens e gânglios (DIAS e DUARTE, 2007; ZINNAU, 2011).

A matéria-prima (carne e toucinho) deve ser moída com auxílio de equipamentos do tipo moedores. A matéria-prima deve ser reduzida a pedaços que possam entrar sem dificuldades pelo moedor. Dessa matéria-prima, as carnes duras devem ser finamente moídas, enquanto as carnes mais macias e as gorduras devem ser moídas em discos de maior calibre. Na misturadeira, adicionam-se as carnes e todos os ingredientes, sendo feita a mistura por tempo adequado, até a massa ter consistência e liga suficiente para embutimento. O misturador deve trabalhar com suas pás homogeneizadoras em baixa rotação ou velocidade, promovendo a mistura uniforme dos ingredientes (DIAS e DUARTE, 2007; ZINNAU, 2011).

O embutimento da massa cárnea deve ser realizado a seguir. A massa (carne, toucinho, ingredientes e condimentos previamente misturados) deve ser embutida como uma massa compacta, sem espaço de ar. As bolhas de ar podem causar oxidação e escurecimento nas regiões circunvizinhas, comprometendo a apresentação do produto final. Nessa operação, pode ser usada uma embutideira. Como envoltórios para as linguiças frescas são utilizados tripas artificiais ou naturais de suínos, bovinos ou ovinos. Simultaneamente ao enchimento da tripa com a massa, são realizadas as torções na tripa. Normalmente, as torções são feitas a cada 10 cm. No caso de envoltório natural, a pressão da massa não deve ser grande, pois esse tipo de envoltório pode encolher após o processo (DIAS e DUARTE, 2007; ZINNAU, 2011).

Depois de finalizada a produção, deve-se embalar as linguiças a vácuo ou em embaladora manual. O produto resfriado é mantido em câmaras com controle de temperatura de (2°C) e depois é transportado e comercializado com temperatura não superior a 7°C, com tempo de vida útil de 2 a 4 semanas. A versão congelada permanece em túneis de congelamento até atingir a temperatura de -12 a -18°C, sendo armazenada e transportada com temperatura não superior a - 8°C, com prazo de validade de 4 a 12 meses (DIAS e DUARTE, 2007; ZINNAU, 2011).

Entre os ingredientes usados no preparo de embutidos não submetidos ao cozimento como a linguiça frescal, é permitida a adição de água ou gelo na proporção máxima de 3% e com finalidade de facilitar a trituração e homogeneização da massa. O cloreto de sódio tem como função agir como agente

bacteriostático e intensificar os sabores e aromas. A quantidade de sal utilizada na elaboração de embutidos varia entre 1 e 5% (DIAS e DUARTE, 2007; ZINNAU, 2011).

Os sais de cura (nitratos e nitritos) desempenham um importante papel no desenvolvimento das características essenciais dos embutidos, já que intervêm no surgimento da cor característica destes, proporcionam um sabor e aroma especial ao produto, possuem atividade antioxidante e antimicrobiana e retardam o desenvolvimento da rancificação (DIAS e DUARTE, 2007; ZINNAU, 2011).

No preparo de linguiça fresca normalmente são utilizadas várias especiarias que podem ser adicionadas inteiras ou moídas. Em geral, não se coloca mais que 1% do total do peso da carne de especiarias. Além conferir aromas e sabores especiais ao embutido, certas especiarias, como a pimenta, a páprica, o tomilho e o alecrim e condimentos como o alho, têm propriedades antioxidantes e antimicrobianas (DIAS e DUARTE, 2007; ZINNAU, 2011).

1.2. Qualidade microbiológica de linguiças do tipo fresco

A linguiça fresca é um produto embutido curado e cru e, portanto, não sofre nenhum processamento industrial que tenha por finalidade a redução da carga de microrganismos e apresenta alta atividade de água. Assim, esse produto tem um tempo de prateleira limitado e por esses motivos sua qualidade microbiológica depende da ausência ou de baixos níveis de contaminação na matéria prima e ingredientes usados no processo produtivo (CORREIA, 2008; MARQUES et al., 2006; MILANI et al., 2003).

Além dos fatores de risco relacionados às suas características intrínsecas, desde o processo de fabricação até o consumo da linguiça fresca também existem os fatores de risco relacionados às suas características extrínsecas, como a participação do manipulador de alimentos e o estoque em temperaturas inadequadas de refrigeração. Essas circunstâncias servem de alerta à qualidade microbiológica do produto final (MARQUES et al., 2006; MEDEIROS, 2011; MERLINI et al., 2012).

Durante a produção da linguiça fresca, na moagem e na mistura dos ingredientes pode ocorrer contaminação através dos equipamentos, utensílios e

manipuladores ou pela adição da matéria-prima ou aditivos contaminados (CORREIA, 2008). Os condimentos adicionados também podem estar contaminados por bactérias patogênicas como *Salmonella* sp. (SILVA et al., 2013). Os envoltórios naturais utilizados nos embutidos são provenientes dos intestinos de animais e também podem ser fontes de contaminação por microrganismos patogênicos, se não foram aplicados cuidados higiênico-sanitários no momento do seu beneficiamento (CORREIA, 2008).

A qualidade final da linguiça frescal é dependente das temperaturas usadas para manter a cadeia de frio. Vários estágios da cadeia de frio, como transporte e salas de estocagem representam pontos críticos para os produtores. Existem ainda etapas que estão fora do controle do produtor como a distribuição final dos produtos. Varejistas nem sempre conseguem manter adequada à cadeia de frio, o que acarreta um aumento dos riscos microbiológicos para produtos cárneos (CORREIA, 2008).

1.3. Doenças transmitidas por alimentos

O aumento da produção e da frequência de consumo de linguiça frescal, faz com que surja uma preocupação em relação à segurança, visto que estes podem ser veiculadores de doenças, gerando um risco à saúde da população (SAMULAK et al, 2011). Entende-se por Doenças Transmitidas por Alimentos, ou DTA's, toda aquela que seja causada pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados, compreendendo um grupo de mais de 250 tipos de DTA's, sendo a maioria causada por bactérias e suas toxinas, vírus e parasitas. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A vigilância epidemiológica de DTA's é baseada na notificação de surtos, definindo como surto a ocorrência de pelo menos dois casos que apresentem os mesmos sintomas após a ingestão de alimentos da mesma fonte. Pelo fato de existirem várias causas, não há um quadro clínico definido, portanto de modo geral os sintomas mais comuns são náuseas, vômito, dores abdominais e diarreia, podendo ou não ser acompanhados de febre. O período de incubação é variável para cada agente etiológico, sendo usualmente entre 1-7 dias, em sua maioria são consideradas doenças autolimitadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Quando se trata de Doenças Transmitidas por Alimentos, deve-se levar em consideração que grande parte dos casos se desenvolve sem que seja necessária a hospitalização e nem o isolamento do agente etiológico no alimento suspeito, logo, a ocorrência de DTA's na população é provavelmente subestimada. Sendo essa subnotificação uma realidade mundial (SHINOHARA et al, 2008).

1.4. Microrganismos de interesse em alimentos

Os alimentos são uma rica fonte de nutrientes para microrganismos, sendo os alimentos de origem animal os principais veiculadores de patógenos relacionados às DTA's. O envolvimento de produtos cárneos na ocorrência de DTA's acontece devido à presença de microrganismos patogênicos na microbiota natural destes animais que contaminam a carcaça durante o abate, e também podem ser transportados do ambiente contaminado para a carcaça (contaminação cruzada) pelo manipulador, utensílios mau higienizados, alimentos e pela água, durante o processo produtivo. Diante disto pode-se dizer que a microbiota de um alimento é o somatório da microbiota natural do alimento e dos microrganismos adquiridos durante as etapas do processo produtivo, através da água, das instalações, do manipulador e dos equipamentos e utensílios (SAMULAK et al, 2011).

A contagem de microrganismos em uma amostra diz muito sobre as condições de higiene nas quais esse alimento foi produzido, e determina também a sua qualidade microbiológica. Existem alguns microrganismos de interesse quando se trata de alimentos, dentre eles, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*.

Os microrganismos da espécie *Staphylococcus aureus* são bactérias gram-positivas, coagulase positivas, não produtoras de esporos, crescem em meios comuns, sendo o ágar sal-manitol um meio seletivo para esta espécie, devido à sua capacidade de fermentar manitol, produzindo ácido láctico. As bactérias *S. aureus* se multiplicam em alimentos com valores de atividade de água inferiores aos mínimos considerados para outras bactérias e têm também como característica a capacidade de sobreviver e se replicar em uma concentração de 15% de cloreto de sódio, conseguindo produzir enterotoxinas em concentrações de sais de até 10%, tornando os alimentos curados potentes veiculadores de intoxicação alimentar. São

importantes agentes etiológicos em intoxicações alimentares, resultantes da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas, que são previamente formadas no alimento contaminado antes do consumo. O diagnóstico de uma infecção estafilocócica é feito através da contagem de *S. aureus* ou da detecção de enterotoxinas estafilocócicas a partir de restos de alimentos (FEITOSA et al, 2017). A contagem destes microrganismos em alimentos pode ser feita com duas finalidades: confirmar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar e fazer o controle de qualidade higiênico-sanitária do processo produtivo, visto que esta bactéria pertence à microbiota dos animais e do manipulador (ALBERTI; NAVA, 2014).

As bactérias do gênero *Salmonella*, pertencem a família Enterobacteriaceae, são bacilos gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos e em sua maioria são móveis. As salmonelas de maior relevância clínica não fermentam a lactose, o que é uma característica para sua diferenciação em ágar que contenham lactose. Para o isolamento de *Salmonella* utiliza-se um meio não seletivo para o pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, e semeadura em ágar seletivo, como o ágar *Salmonella-Shigella* (SS). Quanto à classificação elas são divididas em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo estas espécies subdivididas em sorotipos, tendo como base os seus antígenos: somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi). Dentre eles o mais bem distribuído é o antígeno O, que pode ser identificado em vários sorotipos de *Salmonella*, atualmente existem 2.501 sorotipos de *Salmonella* identificados, porém apenas os sorotipos de *S. enterica* são patogênicos para o homem. São amplamente distribuídas em diversos tipos de hospedeiros, sendo geralmente encontradas em animais, principalmente em aves e suínos. Seus principais veiculadores são os alimentos de origem animal, como carne de frango, ovos e alimentos malcozidos (RALL et al, 2009; TRABULSI e ALTERTHUM, 2005). Os sintomas das salmoneloses incluem dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômito, sendo raros os casos clínicos fatais. No Brasil, a maioria dos casos de surtos alimentares causadores de gastroenterite humana é atribuída à bactéria patogênica *Salmonella* spp. (7,5%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016) e os alimentos mais incriminados são carne bovina, aves, suínos e ovos crus (SHINOHARA et al.,2008).

Os coliformes termotolerantes pertencem à família *Enterobacteriaceae* e são bacilos gram-negativos, que possuem, como habitat natural, o trato intestinal do homem e de animais. Coliformes termotolerantes são definidos como coliformes capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24-48h a 45°C. *Escherichia coli*, juntamente com algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella*, podem apresentar essas características. Entretanto, apenas a presença de *E. coli* em alimentos indica contaminação fecal por ser encontrada em grande quantidade no trato gastrintestinal do homem e animais de sangue quente (ICMSF, 2005).

As bactérias da espécie *E. coli*, pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e móveis, se apresentam em seis subtipos patogênicos que ocasionam diferentes sintomas no organismo hospedeiro. A EPEC (*E. coli* Enteropatogênica) provoca diarreia e desidratação. A EHEC (*E. coli* Entero-hemorrágica) provoca diarreia sanguinolenta, e é produtora da toxina Shiga, faz parte da microbiota natural de bovinos. A EAEC (*E. coli* Enteroagregativa) pode provocar diarreia persistente, levando até a um quadro de desnutrição. A ETEC (*E. coli* Enterotoxigênica) é produtora de duas enterotoxinas (LT – Toxina termolábel e ST – toxina termoestável), responsável pelo quadro conhecido como “diarreia do viajante. A EIEC (*E. coli* Enteroinvasiva) é muito confundida com a *Shigella*, provocando infecção semelhante à desta bactéria. A ExPEC (*E. coli* Extra intestinal patogênica) é causadora de infecções extra intestinais. Todos os subtipos podem ser transmitidos através de alimentos e água contaminados, seja pelo manipulador ou outros fatores (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

1.5. Uso da biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos

Os métodos utilizados para o isolamento de microrganismos compreendem meios de pré-enriquecimento não seletivos, meios de enriquecimento seletivos, meios para semeadura seletivos e/ou diferenciais, seguindo um padrão para cada tipo de microrganismo. Após o isolamento de um determinado microrganismo, as colônias consideradas suspeitas passam por métodos de confirmação bioquímica, sorológica ou detecção de DNA. Essas técnicas têm como finalidade a caracterização de cepas

de microrganismos, colocando em evidência diferentes subtipos da mesma espécie. O método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma boa alternativa para pesquisa de microrganismos em alimentos, e pode apresentar maior eficiência em relação a outros métodos, devido a sua rapidez, sensibilidade e especificidade, porém necessita de tratamento da amostra com meios de enriquecimento, pois os alimentos são matrizes complexas que podem ter interferentes enzimáticos (RALL et al, 2009; GEORGES, 2015).

A técnica de PCR consiste na replicação de sequências específicas de DNA *in vitro*, sendo utilizada em diversos ramos da medicina e biologia. A técnica utiliza a variação de temperaturas para a duplicação de cadeias de DNA, através da síntese enzimática de ácidos nucleicos a partir de uma fita molde, para que a reação ocorra são necessários alguns componentes, o DNA molde, a presença de uma DNA polimerase termoestável (Taq), a presença de um par de primers que (oligonucleotídeos que determinam o trecho de DNA que será replicado), solução tampão para estabilização do pH e deoxinucleotídeos fosfatados (dNTPs). Nesta reação ocorrem 3 etapas básicas de variação de temperatura: 1) Desnaturação: atinge temperaturas de 92°C - 96°C, com o objetivo de separar a dupla fita de DNA. 2) Anelamento: variação de 58° - 65°C, nesta etapa ocorre a ligação dos primers na região complementar da fita molde. 3) Extensão: nesta etapa ocorre a amplificação do DNA pela Taq DNA polimerase, a uma temperatura de 72°C (CAMARGO e SILVA, 2017).

A identificação genética dos microrganismos de interesse em alimentos é de suma importância para que possa ser traçado um perfil epidemiológico referente a cada um desses microrganismos, estabelecendo uma relação causal entre as doenças transmitidas por alimentos e os seus respectivos agentes etiológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de linguiças de frango do tipo frescal comercializadas em supermercados e açougues de Brasília e Taguatinga, Distrito Federal.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

3. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR

Qualidade microbiológica de linguças de frango do tipo frescal comercializadas no Distrito Federal

Stephanie Ramos Franca, Izabel Cristina Rodrigues da Silva, Daniela Castilho Orsi.

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade, Centro Metropolitano, Conjunto A, lote 01, Ceilândia, CEP: 72220-900, Brasília, DF, Brasil. Autor para correspondência: danielacastilhoorsi@gmail.com

RESUMO

A linguça frescal é um dos embutidos cárneos mais consumidos pelos brasileiros e o aumento da produção e do consumo deste alimento chama a atenção para a segurança do mesmo. Assim, este trabalho apresenta a avaliação da qualidade microbiológica de amostras de linguça de frango frescal comercializadas no Distrito Federal. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas, determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. e também identificação molecular de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*. Os resultados do estudo mostraram que das oito amostras de linguça de frango analisadas, três amostras (37,5%) estavam impróprias para o consumo pelo excesso de bactérias *S. aureus*. E a região gênica *Nuc* identificada através de PCR indicou que as bactérias *S. aureus* provenientes dessas amostras de linguças de frango eram produtoras de enterotoxinas. Uma das amostras que já havia sido reprovada pelo excesso de bactérias *S. aureus*, também apresentou *Salmonella* spp. (confirmada geneticamente através da presença do gene *invA*). Apesar do baixo número de coliformes termotolerantes, a presença de *E. coli* foi detectada em quatro amostras de linguças pela técnica de PCR. Os resultados obtidos revelam que o excesso de manipulação da linguça frescal, de fato, reduz a sua qualidade

microbiológica, podendo torná-la um veículo para transmissão de *S. aureus* patogênica produtora de enterotoxinas.

Palavras chave: embutido frescal, linguiça de frango; contaminação de alimentos.

ABSTRACT

Fresh sausage is one of the most consumed meat foods for Brazilians and increasing the production and consumption of this food draws attention to the safety of it. Thus, this work presents the evaluation of the microbiological quality of fresh chicken sausage sold in the Federal District. The analyzes were: total counting of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total coliforms and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* count, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. research and also molecular identification of *E. coli*, *Salmonella* spp. and *S. aureus*. The results of the study showed that of the eight chicken sausage samples analyzed, three samples (37.5%) were unfit for consumption by excess of *S. aureus* bacteria. And the gene *Nuc* region identified by PCR indicated that the *S. aureus* bacteria from the chicken sausage samples were enterotoxin producers. Sample 2, which had already been rejected by the excess of *S. aureus* bacteria, also presented *Salmonella* spp. (genetically confirmed by the presence of the *invA* gene). Despite the low number of thermotolerant coliforms, the presence of *E. coli* was detected in four samples of sausages by the PCR technique. The results show that the excess handling of fresh sausage reduces its microbiological quality and can make it a vehicle for the transmission of pathogenic enterotoxin-producing *S. aureus*.

Palavras chave: fresh sausage, chicken sausage, microbiological quality, Food contamination.

INTRODUÇÃO

As linguiças frescas, também conhecidas como linguiças do tipo frescal, estão entre os produtos embutidos mais consumidos pela população brasileira devido a seu processamento relativamente simples e preço acessível. As matérias-

primas mais utilizadas na produção dessas linguiças são as carnes de porco e de frango (ALBERTI e NAVA, 2014; NASCIMENTO et al., 2012, SOUZA et al., 2014).

A linguiça frescal é um produto embutido curado e cru, portanto não sofre nenhum processo de cozimento e ainda apresenta alta atividade de água. Assim, esse produto tem um curto prazo de validade e por esse motivo sua qualidade microbiológica depende de baixos níveis de contaminação na matéria-prima e nos ingredientes usados no processo produtivo (ALBERTI e NAVA, 2014; BEZERRA et al., 2012).

As prováveis fontes de contaminação microbiológica da linguiça frescal compreendem as carnes, os envoltórios, os condimentos, a manipulação, as máquinas, os utensílios, bem como a água utilizada em todas as operações de limpeza e manutenção (MANTOVANI et al., 2011; MERLINNI et al., 2012).

A qualidade final da linguiça frescal também é dependente das temperaturas usadas para manter a cadeia de frio. Vários estágios da cadeia de frio, como transporte e salas de estocagem representam pontos críticos para os produtores. Existem ainda etapas que estão fora do controle do produtor como a distribuição final dos produtos. Varejistas nem sempre conseguem manter adequada à cadeia de frio, o que acarreta um aumento dos riscos microbiológicos para produtos cárneos (GEORGES et al., 2014).

O aumento da produção e da frequência de consumo de linguiça frescal, faz com que surja uma preocupação em relação à segurança, visto que estes produtos podem ser veiculadores de doenças, gerando um risco à saúde da população (MERLINNI et al., 2012; SAMULAK et al., 2011). Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de linguiças de frango do tipo frescal comercializadas no Distrito Federal.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas

Para as análises microbiológicas, foram coletadas oito amostras de linguiças de frango do tipo frescal, dentro do prazo de validade e expostas ao consumo nos balcões refrigerados, em diferentes supermercados e açougues das cidades de Brasília e Taguatinga, DF. As amostras foram adequadamente acondicionadas e

conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UNB/FCE), onde foram imediatamente analisadas. Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas de cada embalagem e os resultados foram expressos como média em log de UFC/g. Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (até 10^{-3}).

Para a contagem total de bactérias mesófilas e psicrótróficas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para bactérias mesófilas e a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias para bactérias psicrótróficas. Os resultados obtidos foram expressos em log UFC/g. Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lauril Sulfato Triptose. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2% (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em log NMP/g. Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Sal Manitol. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias suspeitas de *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação, pipetou-se 1 ml das alíquotas do caldo de enriquecimento para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo selenito cistina. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h.

Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semearam-se placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram transferidas para tubos inclinados contendo o meio de cultivo Agar TSI (três açúcares e ferro). Os tubos de TSI que apresentaram reações típicas de *Salmonella* foram submetidos à identificação molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Identificação molecular de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*

As bactérias isoladas suspeitas de serem *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. foram identificadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), Para a identificação de *S. aureus* foi utilizado o fragmento de 105 pares de base referente ao gene *Nuc*. Para a identificação de *Salmonella* spp. foi utilizado o fragmento de 445 pares de base referente ao gene *invA*. E para a identificação de *E. coli* foi utilizado o fragmento de 113 pares de base referente ao gene *MalB*. Os primers construídos para este estudo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes *Nuc*, *invA* e *MalB*

Primer	Sequência 5´- 3´	Produto amplificado	Espécie
<i>Nuc</i> foward	TGTTTGTGATGCATTTGCTG		
<i>Nuc</i> reverse	AAAGGGCAATACGCAAAGAG	105 pb	<i>S. aureus</i>
<i>invA</i> foward	GCTGATGCCGGTGAAATTAT		
<i>invA</i> reverse	CGACAAGACCATCACCAATG	445 pb	<i>Salmonella</i> spp.
<i>MalB</i> foward	TCTATGGGCTGTGACTGCTG		
<i>MalB</i> reverse	GGCATCCCCATGATGTAGTT	113 pb	<i>E. coli</i>

As colônias isoladas suspeitas de serem *S. aureus* ou *Salmonella* spp. ou *E. coli* foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusion e incubadas a

37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial Plasmid DNA purification MACHEREY-NAGEL®. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 50°C por 2 min., 95°C por 2 min. e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., seguida de 60°C por 30 seg., para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg. para a extensão dos fragmentos. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot®, 5 U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação, com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas oito amostras de linguiça de frango frescal coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais do Distrito Federal, sendo todas industrializadas. Os resultados das análises microbiológicas estão apresentados na Tabela 2.

A contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas da maioria das amostras apresentaram-se dentro dos limites aceitáveis de consumo (2,80 a 6,58 log UFC/g). Embora a legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabeleça um limite para bactérias mesófilas e psicotróficas nos alimentos em geral, consideram-se como limite aceitável valores que não excedam 7,0 log UFC/g, estabelecidos pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 2002). Duas amostras deste estudo (amostras 7 e 8) apresentaram elevada contagem de microrganismos mesófilos de 7,27 e 7,18 log UFC/g, respectivamente. Essa quantidade elevada de microrganismos mesófilos, além de reduzir o tempo de prateleira desses produtos, também indica falta de higiene na manipulação durante o processo produtivo. De acordo com SOUZA et al. (2014) produtos cárneos embu-

tidos podem apresentar uma elevada carga de microrganismos mesófilos devido ao intenso manuseio e aos equipamentos e condimentos contaminados.

Tabela 2. Análises microbiológicas das amostras de linguiça de frango frescal

Amostras	Bactérias mesófilas (log UFC/g)	Bactérias psicrotróficas (log UFC/g)	Coliformes totais (log NMP/g)	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)	<i>S. aureus</i> (log UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.
1	5,75 ± 0,01	5,77 ± 0,01	1,64 ± 0,63	0,18*	1,53 ± 0,42	Ausência
2	5,26 ± 0,11	5,02 ± 0,13	1,69 ± 0,50	0,50 ± 0,48	4,02 ± 0,06	Presença
3	4,76 ± 0,24	5,25 ± 0,41	2,44 ± 0,72	0,55 ± 0,32	3,93 ± 0,05	Ausência
4	5,67 ± 0,03	5,15 ± 0,05	1,48 ± 0,42	0,44 ± 0,38	1,75 ± 0,21	Ausência
5	2,80 ± 0,22	3,02 ± 0,13	1,16 ± 0,89	0,15*	ND	Ausência
6	4,88 ± 0,81	6,58 ± 0,01	1,39 ± 0,21	0,15*	1,33 ± 0,00	Ausência
7	7,27 ± 0,03	5,23 ± 0,18	3,04 ± 0,00	ND	ND	Ausência
8	7,18 ± 0,01	5,79 ± 0,02	1,74 ± 0,38	ND	4,01 ± 0,06	Ausência

Os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições; ND = não detectado; * = não foi possível calcular o desvio padrão, pois apenas uma bateria de tubos apresentou resultados positivos.

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) também não estabelece um padrão microbiológico para contagem de coliformes totais para os alimentos em geral, porém é importante analisar a presença deste grupo por ser indicador da qualidade higiênicossanitária dos alimentos (LUNDGREN et al., 2009). Neste estudo, todas as amostras de linguiça de frango frescal apresentaram coliformes totais com valores variando entre 1,16 e 3,04 log NMP/g. A amostra 7 apresentou condições insatisfatórias de higiene pelo elevado número de coliformes totais (3,04 log NMP/g).

Já para os coliformes termotolerantes a legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece um limite de 3,7 log NMP/g. A presença de coliformes termotolerantes é indicativa de contaminação fecal e de condições higiênicossanitárias precárias na manipulação e na cadeia produtiva da linguiça (ALBERTI e NAVA, 2014). As amostras deste estudo mostraram um número baixo de coliformes termotolerantes

(entre 0,15 e 0,55 log NMP/g.), sendo que nas amostras 7 e 8 não foram detectados coliformes termotolerantes.

Resultados semelhantes a este estudo foram reportados por BEZERRA et al. (2012), onde as 28 amostras de linguiça toscana analisadas encontraram-se dentro dos limites aceitáveis para coliformes termotolerantes. No estudo de MANTOVANI et al. (2011), as 18 amostras de linguiças frescal analisadas também se encontraram dentro dos limites aceitáveis para coliformes termotolerantes. Outros estudos reportaram contagens mais elevadas de coliformes termotolerantes em amostras de linguiças frescas. Nos resultados encontrados por MARQUES et al. (2006), das 40 amostras de linguiça frescal analisadas, 14 amostras (35%) apresentaram excesso de coliformes termotolerantes. E no estudo de MERLINNI et al. (2012), das 40 amostras de linguiça frescal analisadas, 20 amostras (50%) estavam com excesso de coliformes termotolerantes .

A presença de coliformes totais e termotolerantes podem ser minimizadas se forem aplicadas as Boas Práticas de Fabricação, embora sua presença também esteja relacionada à contaminação da carne no momento do abate, se multiplicando na matéria prima através do aumento de superfície de contato provocado pela moagem da carne (LUNDGREN et al., 2009; SAMULAK et al, 2011).

Neste estudo a maioria das amostras de linguiça de frango analisadas (seis amostras, 75%), estava contaminada com bactérias *S. aureus*. A intensa manipulação da linguiça desde a fabricação até o consumo e a qualidade da matéria prima são os fatores que propiciam a contaminação com *S. aureus* (ALBERTI e NAVA, 2014). E as amostras 2, 3 e 8 apresentaram contagens de *S. aureus* acima do permitido pela legislação brasileira (3,7 log UFC/g). Sendo assim, das oito amostras de linguiça de frango analisadas, três amostras (37,5%) estavam impróprias para o consumo pelo excesso de bactérias *S. aureus*.

Resultados similares foram reportados por MERLINNI et al. (2012), onde das 40 amostras de linguiça frescal adquiridas no comércio varejista do município de Umuarama, PR, 15 amostras (37,5%) estavam com excesso de *S. aureus*. MARQUES et al. (2006) verificaram que 14 amostras (35%) de linguiça tipo frescal adquiridas nos municípios de Lavras e Três Corações, MG, encontravam-se impróprias para o consumo pelo excesso de bactérias *S. aureus*. ALBERTI e NAVA (2014) na avaliação de linguiças frescal no município de Xaxim, SC, relataram que

50% das amostras de supermercados e 100% das artesanais apresentaram-se contaminadas com cepas de *S. aureus*.

A presença de bactérias *S. aureus* na linguiça indica falha nas Boas Práticas de Fabricação e falta de higiene do manipulador. Essa bactéria é encontrada nas fossas nasais e na pele de pessoas saudáveis e a frequência de portadores é relativamente alta (30-50%). A bactéria *S. aureus* é transmitida aos alimentos principalmente pelo homem e pelas condições inadequadas de higiene, possibilitando também contaminações cruzadas por contato com equipamentos, utensílios e com a matéria-prima (SANTANA et al., 2010).

A amostra 2 que já havia sido reprovada pelo excesso de bactérias *S. aureus*, também apresentou *Salmonella* spp. Encontrar *Salmonella* spp. na linguiça frescal é preocupante, visto que essa bactéria entérica é responsável por quadros frequentes de infecções alimentares. Embora a *Salmonella* spp. presente nas amostras possa ser inativada pelo processamento térmico do alimento, pode haver riscos de contaminação cruzada de outros alimentos em contato com a mesma superfície de preparo, bem como a recontaminação desse alimento, após tratamento térmico (ALBERTI e NAVA, 2014).

DAGUER et al. (2011) analisaram 51 amostras de linguiças frescas e cinco amostras (9,8%) apresentaram-se contaminadas por *Salmonella* spp. DIAS et al. (2008) detectaram *Salmonella* spp. em duas amostras de linguiça suína (9,5%) e três de linguiça de frango (13,6%). Resultados diferentes foram encontrados por ALBERTI e NAVA (2014), MANTOVANI et al. (2011) e MARQUES et al. (2006), os quais não detectaram a presença de *Salmonella* spp. nas amostras de linguiças frescas analisadas.

Por meio das análises moleculares foram confirmadas as colônias de *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *E. coli* em algumas das amostras analisadas, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3. Análises moleculares das amostras de linguiça de frango frescal

Amostras	Bactéria e gene amplificado na PCR		
	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>
1	<i>Nuc</i>	-	<i>MalB</i>
2	<i>Nuc</i>	<i>invA</i>	<i>MalB</i>
3	<i>Nuc</i>	-	-
4	<i>Nuc</i>	-	<i>MalB</i>
5	-	-	-
6	<i>Nuc</i>	-	<i>MalB</i>
7	-	-	-
8	<i>Nuc</i>	-	-

Bactérias *S. aureus* foram identificadas em seis das oito amostras de linguiças de frango analisadas. O gene *Nuc* codifica termonuclease de *S. aureus*, nessa sequência específica, foi utilizado no estudo de GANDRA et al. (2011) para diferenciar espécies enterotoxigênicas de *Staphylococcus aureus* de espécies não patogênicas como *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*.

Apesar do baixo número de coliformes termotolerantes, bactérias *E. coli* foram detectadas em quatro amostras de linguiças pela técnica de PCR. O gene *MalB* é específico para a formação de acetaldeído e amônia a partir de etanolamina. WANG et al. (1997) usaram o gene *MalB* para detecção de *E. coli* em amostras de frutos do mar. Todos os sorotipos de *E. coli* testados tiveram amplificação para o fragmento de DNA correspondente ao gene *MalB* e não foi obtido amplificação de DNA para outras *Enterobacteriaceae* testadas (*Enterobacter* spp., *Samonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*).

Salmonella spp. foi identificada na amostra dois de linguiça de frango. O gene *invA* é amplamente utilizado em ensaios de PCR para detecção do gênero *Salmonella*. Todas as cepas de *Salmonella* apresentam resultados positivos para o gene *invA*, que codifica um componente essencial do aparato de secreção de proteínas associadas à invasão celular (DE CLERCQ et al., 2007; EL-SEBAY et al, 2017).

CONCLUSÃO

Nesse estudo foi avaliada a qualidade microbiológica de linguiças de frango do tipo frescal comercializadas em supermercados e açougues de Brasília e Taguatinga, Distrito Federal. Os resultados mostraram que das oito amostras analisadas, três delas foram reprovadas para consumo devido à contagem de *S. aureus* estar acima do limite estabelecido pela legislação brasileira. A presença desta bactéria indica principalmente falta de higiene da parte do manipulador, visto que esta bactéria é encontrada nas fossas nasais de seres humanos. Os resultados obtidos revelam que o excesso de manipulação da linguiça frescal reduz a sua qualidade microbiológica, podendo torná-la um veículo para transmissão de microrganismos patogênicos. Por ser um alimento amplamente consumido, seu processo produtivo deveria ser mais rigoroso em relação à higiene e manutenção da cadeia do frio, podendo com essas medidas minimizar a contaminação microbiana e melhorar a qualidade final das linguiças frescas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, J; NAVA, A. Avaliação higiênicossanitária de linguiças tipo frescal comercializadas a granel por supermercados e produzidas artesanalmente no município de Xaxim, SC. **Unoesc & Ciência**, v. 5, n. 1, p. 41-48, 2014.

BEZERRA, M.V.P.; ABRANTES, M.R.; SILVESTRE, M.K.S.; SOUSA, E.S.; ROCHA, M.O.C.; FAUSTINO, J.G.; SILVA, J.B.A. Avaliação microbiológica e físico-química de linguiça toscana no município de Mossoró, RN, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 2, p. 297-300, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de janeiro de 2001.

DAGUER, H. et al. Qualidade de produtos cárneos fabricados sob inspeção federal no estado do Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 359-364, 2011.

DE CLERCQ, D.; HEYNDRICKX, A. C. M.; COOSEMANS, J.; J. RYCKEBOER. A Rapid Monitoring Assay for the Detection of *Salmonella* spp. and *Salmonella* Senftenberg Strain W775 in Composts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 2102-2112, 2007.

DIAS, P. A. et al. Qualidade higiênico sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no Sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 3, p. 359-363, 2008.

EL-SEBAY, N. A. et al. InvA gene sequencing of *Salmonella typhimurium* isolated from Egyptian poultry. **Asian Journal of Scientific Research**, v. 10, p. 194-202, 2017.

GANDRA et al. Standardization of a multiplex PCR for the identification of coagulase-positive *Staphylococcus*, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 4, p. 946-949, 2011.

GEORGES, S. O.; BERNARDO, L. G.; BORGES, L. J.; ANDRÉ, M. C. D. P. B. **Relação entre a qualidade microbiológica de linguiça do tipo frescal e sua respectiva temperatura de armazenamento**. In: Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, São Paulo: Editora Blucher, 2014.

LUNDGREN, U. P.; SILVA, A. J.; MACIEL, F. J.; FERNANDES, M. T. Perfil da qualidade higiênicossanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa, PB. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 113-119, 2009.

MANTOVANI, D.; CORAZZA, M. L.; FILHO, L. C.; COSTA, S. C. Avaliação higiênicossanitária de linguiças tipo frescal após inspeção sanitária realizada por

órgãos federal, estadual e municipal na região noroeste do Paraná, **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 3, p. 357-362, 2011.

MARQUES, S. C.; BOARI, C. A.; BRCKO, C. C.; NASCIMENTO, A. R.; PICCOLI, R. H. Avaliação higiênicossanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.6, p.1120-1123, 2006.

MERLINI, L. S.; BEGOTTI, I. L.; MERLINI, N. B.; CAETANO, I. C. S. Avaliação higiênicossanitária de linguiças tipo frescal produzidas artesanalmente na região noroeste do Paraná. **Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 15, p. 344-352, 2012.

NASCIMENTO, R. S.; FONSECA, A. B. M.; FRANCO, R. M.; MIRANDA, Z. B. Linguiças frescas elaboradas com carne de avestruz: características físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p. 184-188, 2012.

RALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; SILVA, M. G.; RALL, R.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e linguiças comercializados na cidade de Botucatu, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 167-174, 2009.

SAMULAK, R. L.; ZANETTI, G. F.; RODRIGUES, S. A.; BITTENCOURT, J. V. M.; Condição higiênicossanitária de abatedouro frigorífico e fábrica de embutidos no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 05, p. 408 – 417, 2011.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SOUZA, M.; PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; MOURA, A. C. Qualidade higiênicossanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguiças frescas

produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil, **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.2, p. 107-112, 2014.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 727-736, 1997.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ALBERTI, J; NAVA, A. Avaliação higiênicossanitária de linguiças tipo frescal comercializadas a granel por supermercados e produzidas artesanalmente no município de Xaxim, SC. **Unoesc & Ciência**, v. 5, n. 1, p. 41-48, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 9.013 de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283/1950 e a Lei nº 7.889/1989, que dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. RISPOA. Diário Oficial da União. Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 12 de 02 de janeiro de 2001, Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, Diário Oficial da União. Brasília.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 04 de 2000. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. Diário Oficial da União, Brasília.

CAMARGO. C. F.; SILVA P. R. Q. **Aplicação das Técnicas de PCR e suas Técnicas Derivadas em Diagnóstico Molecular**. Disponível em:
<<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/CLEYTON%20FLOREN%20CIO%20DE%20CAMARGO%20E%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>
Acesso: 10 de novembro de 2017.

CORREIA, L. M. M. **Multiplicação de microbiota autóctone e de *Staphylococcus aureus* inoculado em linguiças frescas produzidas com diferentes concentrações de sais de cura**. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2008.

DIAS, R. P.; DUARTE, T. F. **Processamento de linguiça frescal e defumada de caprinos e ovinos**, EMBRAPA: Comunicado técnico, 2007.

GEORGES, S. O. **Qualidade microbiológica de linguiças do tipo frescal e caracterização de isolados de *Escherichia coli***, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, 2015.

GEORGES, S. O. et al. Relação entre a qualidade microbiológica de linguiça do tipo frescal e sua respectiva temperatura de armazenamento. In: **Anais do 12º Congresso Latino-americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos**. São Paulo: Editora Blucher, 2014.

ICMSF. 2005. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

MARQUES, S. C.; BOARI, C. A.; BRCKO, C. C.; NASCIMENTO, A. R.; PICCOLI, R. H. Avaliação higiênicossanitária de linguiças tipo frescal comercializadas nos municípios de Três Corações e Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.6, p.1120-1123, 2006.

MEDEIROS, N. X. **Exposição ao risco microbiológico pela contaminação de linguiças do tipo frescal e salsichas**. 2011. 28 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

MERLINI, L. S.; BEGOTTI, I. L.; MERLINI, N. B.; CAETANO, I. C. S. Avaliação higiênicossanitária de linguiças tipo frescal produzidas artesanalmente na região noroeste do Paraná. **Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 15, p. 344-352, 2012.

MILANI, L.; FRIES, L. PAZ, P., BELLÉ, M.; TERRA, N. Bioproteção de linguiça de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, p. 161-166, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 – 2011**. Disponível em: <<http://www.portal.saude.gov.br>

MINISTÉRIO DA SAUDE. Brasil. 2017. **Doenças Transmitidas por Alimentos.**

Disponível em:

<<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o->

ministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta. Acesso: 14 de maio 2017.

NASCIMENTO, R. S.; FONSECA, A. B. M.; FRANCO, R. M.; MIRANDA, Z. B. Linguiças frescas elaboradas com carne de avestruz: características físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 42, n. 1, p. 184-188, 2012.

OLIVEIRA, M. J.; ARAÚJO, W. M. C.; BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiças do tipo frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 736-742, 2005.

RALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; SILVA, M. G.; RALL, R., ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e linguiças comercializados na cidade de Botucatu. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, p. 167-174, 2009.

SAMULAK, R. L.; ZANETTI, G. F.; RODRIGUES, S. A.; BITTENCOURT, J. V. M.; Condição higiênicossanitária de abatedouro frigorífico e fábrica de embutidos no estado do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 05, p. 408 – 417, 2011.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.

SILVA et al. Análise microbiológica de condimentos comercializados na feira central de Campina Grande – PB, **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 9, n. 2, p. 83- 87, 2013.

SOUZA, M.; PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; MOURA, A. C. Qualidade higiênicossanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 2, p. 107-112, 2014.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Atheneu, 2005. 718 p.

ZINNAU, E. R. **Desenvolvimento de linguças frescas de filé de frango com queijo e com azeitona**. 2011. 50 f. Relatório de pesquisa. Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2011.

ANEXO 1

LISTA DE FIGURAS

- Figura A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *nuc* de *S. aureus*.
..... 37
- Figura B. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *MalB* de *E. coli*.
..... 38
- Figura C. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *invA* de *Salmonella entérica*
..... 39
- Figura D. Aspecto das bactérias mesófilas em placas de ágar padrão para contagem da amostra 7, em triplicata, na diluição 10^{-1} 40

ANEXO 2

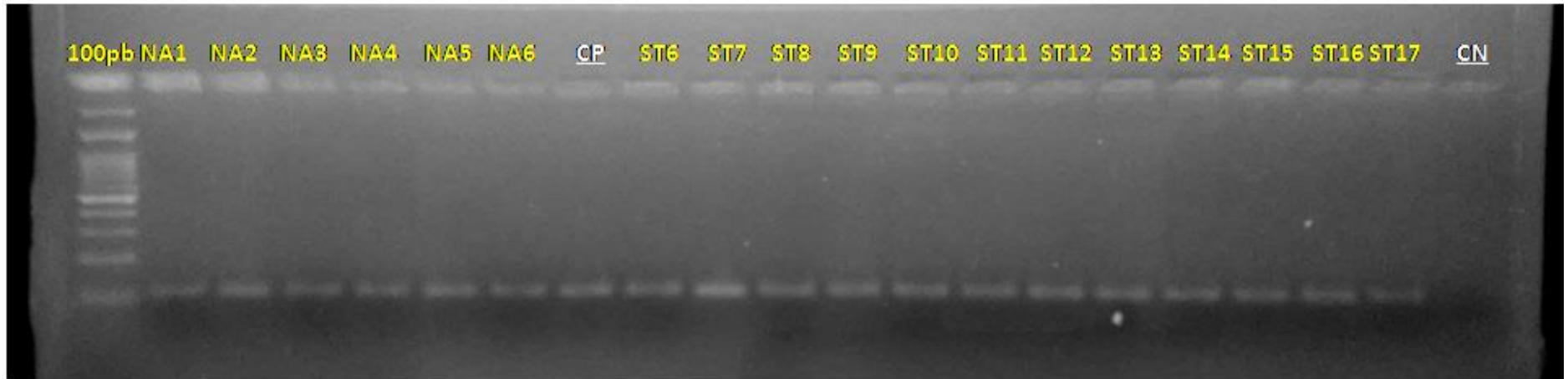


Figura A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *nuc* de *S. aureus*. 100pb = marcador de 100 pb; ST6 a ST17 = amostras deste estudo com amplicons de *nuc* (105 pb); NA1 a NA6 = controles internos do laboratório; CP= controle positivo *S. aureus* ATCC 33862, CN = Controle Negativo.

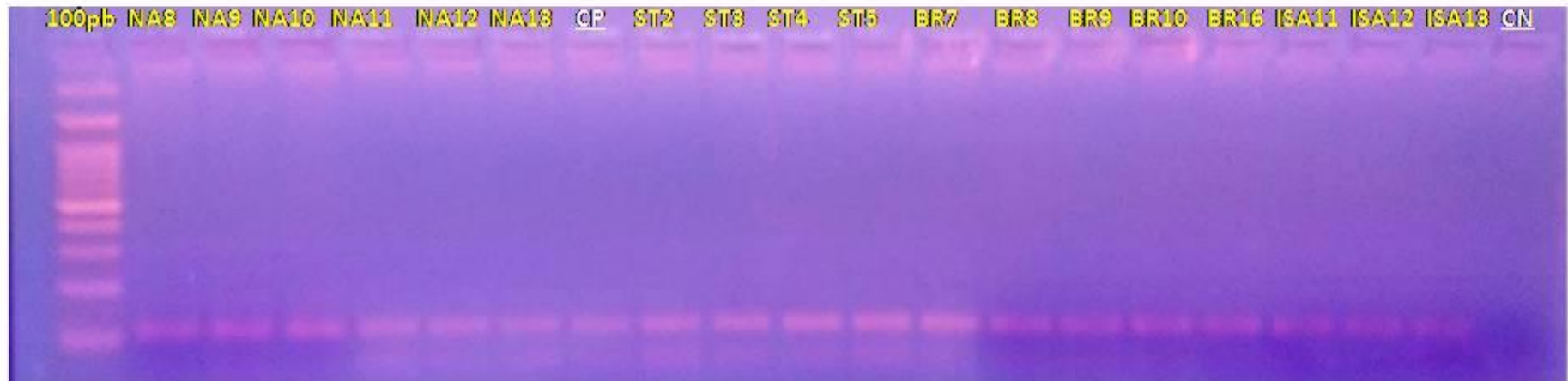


Figura B. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *MalB* de *E. coli*. 100pb = marcador de 100 pb; ST2 a ST5= amostras deste estudo com amplicons de *MalB* (113 pb); NA8 a NA13, BR7 a BR10 e ISA11 a ISA 13 = controles interno do laboratório, CP= Controle positivo *E. coli* ATCC 29213; CN = Controle Negativo.

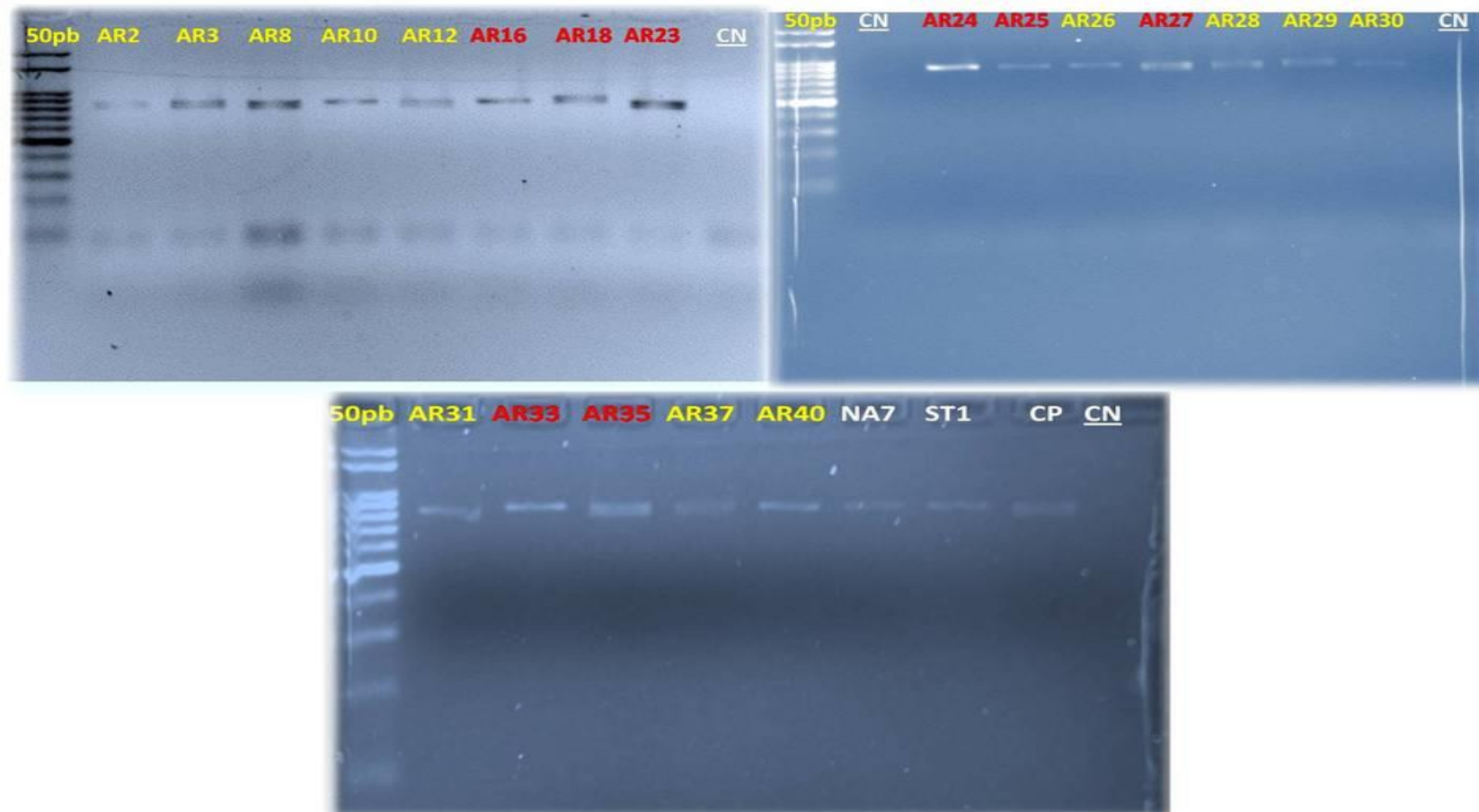
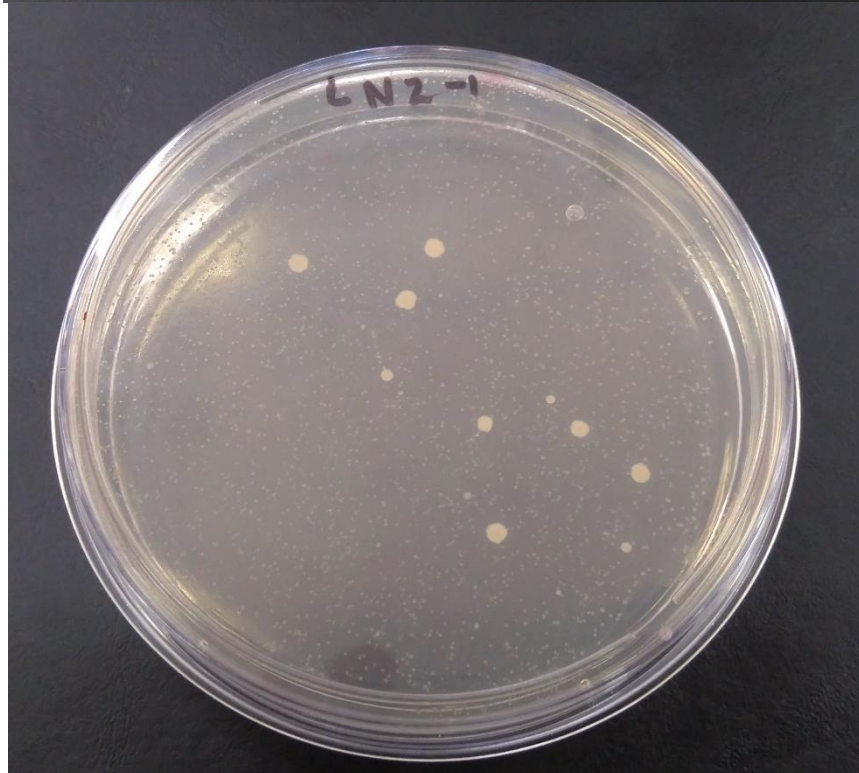
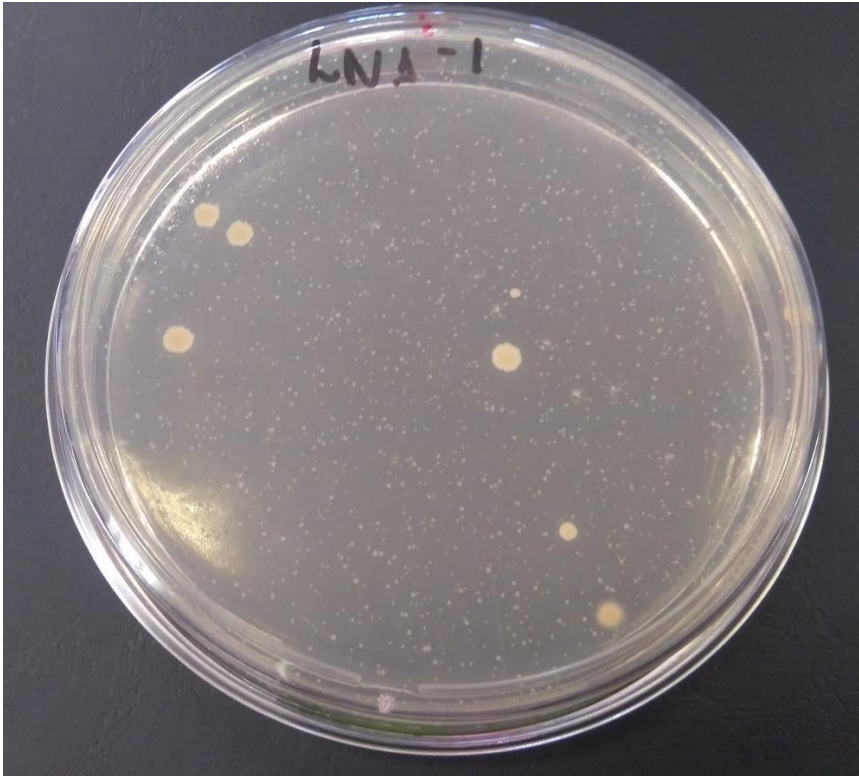


Figura C. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *invA* de *Salmonella entérica*. M = marcador de 100 pb; ST1 = amostra deste estudo com amplicons de *invA* (445 pb) AR2 a AR40 e NA7 = controles internos do laboratório, CP= controle positivo *Salmonella entérica* ATCC 14028; CN = Controle Negativo.

ANEXO 3



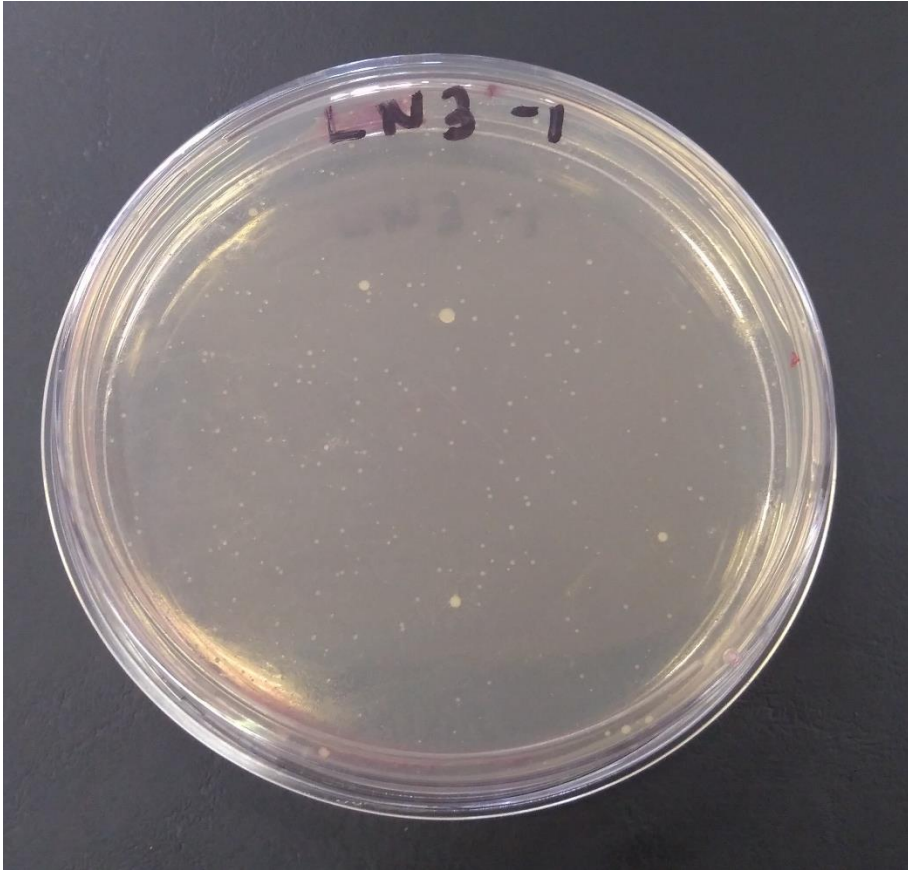


Figura D. Aspecto das bactérias mesófilas em placas de ágar padrão para contagem da amostra LN, em triplicata, na diluição 10^{-1} .