

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

BRUNA IANKA BERNARDES DE JESUS GOMES

**Avaliação da qualidade microbiológica de linguças de frango do tipo frescal
comercializadas em supermercados do Distrito Federal**

BRASÍLIA, DF
2021

BRUNA IANKA BERNARDES DE JESUS GOMES

**Avaliação da qualidade microbiológica de linguiças de frango do tipo frescal
comercializadas em supermercados do Distrito Federal**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Farmacêutica Sabrina Lunara Santos Pavelquesi

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, DF

2021

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

GG633a Gomes, Bruna Ianka Bernardes de Jesus
Avaliação da qualidade microbiológica de linguças de frango do tipo frescal comercializadas em supermercados do Distrito Federal / Bruna Ianka Bernardes de Jesus Gomes; orientador Sabrina Lunara Santos Pavelquesi; co-orientador Daniela Castilho Orsi. -- Brasília, 2021.
33 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. Linguça de frango. 2. Contaminação de alimentos. 3. Salmonella. I. Pavelquesi, Sabrina Lunara Santos, orient. II. Orsi, Daniela Castilho, co-orient. III. Título.

BRUNA IANKA BERNARDES DE JESUS GOMES

**Avaliação da qualidade microbiológica de linguças de frango do tipo frescal
comercializadas em supermercados do distrito federal**

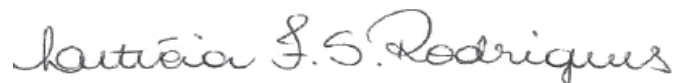
BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Farmacêutica Sabrina Lunara Santos Pavelquesi
(FCE/ Universidade de Brasília)



Farmacêutica Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira
(FCE/ Universidade de Brasília)



Farmacêutica Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2021

Ao meu pai, Isaias (em memória).

AGRADECIMENTOS

Mormente, a Deus, o qual me deu forças para persistir e continuar o curso, mesmo após momentos árduos, Ele é primordial na minha vida.

Aos meus pais, Marisa e Isaias, a quem honro hoje e sempre, por terem lutado para me fornecer um ensino de qualidade, os recompenso com esse trabalho de conclusão de curso, como forma de gratidão e realização de um sonho, principalmente do meu pai, que não está mais entre nós, mas sei que certamente tem orgulho por eu ter chegado até aqui, saibam que foi por Deus e por você, pai.

À toda minha família, em especial, ao meu irmão Bruno, o qual tenho imensa admiração por tamanha determinação. Obrigada pelo apoio concedido!

Aos meus amigos, Vitor e Fernanda, os quais foram cruciais na reta final da minha atual jornada acadêmica, à Edith e ao Luis que sempre me apoiaram e estiveram presentes, são amizades que levarei para a vida.

Ao meu companheiro Felipe, pelo amparo e inventivo constante, o que foi imprescindível no decorrer desse trabalho.

Por fim, minha imensa gratidão à Farmacêutica Sabrina e à professora Dra. Daniela Orsi, por terem aceitado o meu convite para me nortear durante o atual período.

RESUMO

As linguiças frescas estão entre os embutidos cárneos mais consumidos pela população brasileira devido ao preço acessível. Esse estudo avaliou a qualidade microbiológica de linguiças de frango frescas comercializadas no Distrito Federal. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicrófilas, determinação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* spp. Os resultados mostraram que das 8 amostras de linguiça de frango analisadas, 7 amostras (87,5%) estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, apresentando elevada contagem de microrganismos mesófilos ($> 6,0 \log \text{ UFC/g}$) e 3 amostras (37,5%) também estavam contaminadas com *Salmonella* spp. As bactérias *Salmonella* spp. foram geneticamente confirmadas por meio da detecção de gene *invA* por PCR. Assim, o uso de matérias primas contaminadas, a falta de higiene durante o processamento e o armazenamento inadequado da linguiça fresca compromete a sua qualidade e pode trazer risco a saúde do consumidor, pois a presença de bactérias patogênicas pode levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar.

Palavras-chave: Linguiça de frango. Contaminação de alimentos. *Salmonella*.

ABSTRACT

Fresh sausages are one of the meat products most consumed by the Brazilian population due to their affordable price. This study evaluated the microbiological quality of fresh chicken sausages marketed in the Federal District. The analyzes performed were: total count of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total coliforms and thermotolerant coliforms, count of *Staphylococcus aureus* and research of *Salmonella* spp. The results showed that of the 8 samples of chicken sausage analyzed, 7 samples (87.5%) were unfit for consumption according to Brazilian legislation, showing a high count of mesophilic microorganisms ($> 6.0 \log$ CFU / g) and 3 samples (37.5%) were contaminated with *Salmonella* spp. The bacteria *Salmonella* spp. was genetically confirmed by detection of the *Inva* gene by PCR. Thus, the use of contaminated raw materials, the lack of hygiene during processing and the inadequate storage of fresh sausages compromise their quality and may pose a risk to consumer health, as the presence of pathogenic bacteria can lead to food-borne diseases.

Keywords: Chicken sausage. Food contamination. *Salmonella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gel de eletroforese mostrando a amplificação por PCR do gene *invA* identificado em cepas isoladas de três amostras de linguiças de frango frescal28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência do primer e tamanho do produto amplificado na PCR para identificação do gene <i>invA</i>	23
Tabela 2 - Análises microbiológicas das amostras de linguiça de frango do tipo frescal.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LB	Caldo Luria Bertani
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
NMP	Número Mais Provável
SS	Ágar Salmonella Shigella
TSI	Ágar Três Açúcares e Ferro
LIA	Ágar Lisina Ferro
FA	Ágar Fenilalanina
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Culinária brasileira e o consumo de linguiça do tipo frescal	14
2.2	Qualidade microbiológica das linguiças do tipo frescal	14
2.3	Legislação brasileira e limites microbiológicos para linguiça do tipo frescal	17
2.4	Uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na identificação de espécies de bactérias patogênicas.....	17
3	JUSTIFICATIVA	19
4	OBJETIVOS	20
4.1	Objetivo geral	20
4.2	Objetivos específicos	20
5	MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1	Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas	21
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7	CONCLUSÕES	29
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

As linguiças frescas, também conhecidas como linguiças do tipo frescal, estão entre os produtos embutidos mais consumidos pela população brasileira devido ao 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).

As linguiças são obtidas a partir de carnes de animais, adicionadas ou não de ingredientes e tecido adiposo, sendo envolvida em um envoltório natural ou artificial, submetida a um método de preparação adequado, onde se podem classificá-las como frescas, curadas, secas, cozidas e ou maturadas (BRASIL, 2000).

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 dessa cadeia, 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 alimentar, visto que estes embutidos podem ser veiculadores de doenças, gerando um risco à saúde da população (MERLINNI et al., 2012; SAMULAK et al., 2011).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Culinária brasileira e o consumo de linguiça do tipo frescal

As linguiças frescas, também conhecidas como linguiças do tipo frescal, são populares no Brasil e destacam-se pelo sabor peculiar, preço acessível e questões culturais, como o hábito da população brasileira em consumir alimentos embutidos, tais como salsicha, salame, mortadela, presunto e as variações de linguiça. Esse produto cárneo é um dos mais consumidos no Brasil, principalmente devido ao avanço tecnológico, o qual tem garantido o desenvolvimento de diversos tipos de linguiça, com diferenciação de formas, tamanhos, sabores, valor calórico e preço de mercado (SILVA et al., 2016). No Brasil, os embutidos crus, como a linguiça do tipo frescal, são elaborados a partir da carne de suínos, bovinos e aves, e verifica-se bastante variação no produto, envolvendo aspectos referentes às características sensoriais, à composição centesimal e ao valor nutritivo (OLIVEIRA et al., 2005).

2.2 Qualidade microbiológica das linguiças do tipo frescal

A linguiça frescal é um produto que não sofre processamento térmico e apresenta alta umidade, e por isso tem curto prazo de validade comercial e sua qualidade microbiológica depende de baixos níveis de contaminação microbiana na matéria-prima empregada na sua produção. A elaboração desse embutido requer várias etapas de manipulação, o que aumenta as possibilidades de contaminação por microrganismos patogênicos ou deterioradores, podendo comprometer a segurança microbiológica do produto, caso ocorram falhas higiênicas durante o processamento (CORREIA, 2008; SILVA, et al., 2016).

As prováveis fontes de contaminação para linguiças compreendem as carnes, os envoltórios, os temperos ou condimentos, a manipulação, as máquinas, os utensílios, bem como a água utilizada em todas as operações de limpeza e manutenção. Pela maneira em que é produzida e comercializada, a linguiça frescal pode apresentar altos riscos de contaminação por agentes microbianos, principalmente pelo envolvimento dos manipuladores que realizam o processo de industrialização, facilitando a entrada de agentes contaminantes, além do uso de

equipamentos e utensílios que devem ser higienizados para evitar possíveis contaminações. Essas condições desfavoráveis de processamento de carnes são vetores para a proliferação exponencial de microrganismos nesses alimentos, levando à deterioração precoce do produto (CORREIA, 2008; SILVA, et al., 2016).

Dessa forma, a avaliação da qualidade desses alimentos pode ser feita pelos caracteres organolépticos, como aparência, sabor, consistência e odor, e pela enumeração de microrganismos indicadores de condições sanitárias dos alimentos. Nesse tipo de alimento, destaca-se a contaminação por coliformes totais, um grupo de bactérias gram-negativas pertencentes a família *Enterobacteriaceae* que fermentam a lactose, produzindo ácido e gás a 35/37°C (FRANCO e LANDGRAF, 2005). A contaminação da linguiça frescal por coliformes totais pode ser minimizada com a aplicação correta de Boas Práticas de Higiene. No entanto, a contaminação pode também estar relacionada à carne previamente contaminada. No momento do abate, pode haver um extravasamento do conteúdo intestinal do animal, que leva à contaminação da carcaça que servirá de matéria-prima para derivados cárneos. A carcaça contaminada, ao ser moída para a produção de embutidos, tem sua multiplicação estimulada pelo aumento da superfície de contato (SILVA et al., 2016).

A enumeração de coliformes termotolerantes nos alimentos fornece informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação eventual da presença de enteropatógenos. Dentre as espécies que compõem os coliformes termotolerantes, a *Escherichia coli* é a mais importante, pois seu habitat é o intestino do homem e animais, se tornando um indicador de contaminação fecal. Coliformes termotolerantes são um grupo de bactérias gram-negativas, também pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, que fermentam a lactose, produzindo ácido e gás a 44-45°C (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Outra importante bactéria a ser analisada é *Staphylococcus aureus*, e sua contagem em alimentos pode ser feita com dois objetivos diferentes: um relacionado à saúde pública, para confirmar o envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, e outro relacionado ao controle da qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, condição em que o *S. aureus* serve como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de sanitização das superfícies destinadas ao contato com alimento (FORSYTHE, 2005; FRANCO e LANDGRAF, 2005).

O gênero de bactérias *Staphylococcus* se caracteriza na microscopia por células esféricas, gram-positivas, e que geralmente se dispõem em cachos irregulares, semelhantes a cachos de uva. Crescem rapidamente em diversos meios de cultura, fermentam carboidratos e suas colônias apresentam coloração que varia de branco a amarelo intenso. Alguns são membros da microbiota da pele e das mucosas de humanos, outras provocam infecções biogênicas como formação de abscessos e até mesmo septicemia fatal (CASSETTARI et al., 2005; FRANCO e LANDGRAF, 2005).

A bactéria *S. aureus* patogênica hemolisa o sangue, coagula o plasma e produz uma série de enzimas e toxinas extracelulares. O mecanismo de patogenicidade de *S. aureus* é caracterizado por uma intoxicação alimentar causada por toxinas produzidas quando o número de células atinge 10^6 UFC por grama de alimento. Na maioria dos casos, os sintomas de náuseas e vômitos aparecem entre 2 a 4 horas após a ingestão do alimento contaminado. Em geral, alimentos que requerem muita manipulação durante o preparo e que, após, não são mantidos refrigerados, apresentam maior risco de causar intoxicação estafilocócica (CASSETTARI et al., 2005; FORSYTHE, 2005; FRANCO e LANDGRAF, 2005).

As bactérias do gênero *Salmonella* habitam o trato intestinal dos animais, especialmente nas aves e nos suínos, podendo estar presentes também nos alimentos, no meio ambiente e em seres humanos, e apresentam potencial patogênico para humanos e para muitas espécies de animais (IGLESIAS, 2010). A *Salmonella* é uma das bactérias que mais causam infecções de origem alimentar em seres humanos, sendo que sua transmissão ocorre por meio da via fecal-oral, e a contaminação de carnes e derivados pode ocorrer por meio de animais portadores ou de profissionais infectados, associados às falhas nas práticas higiênicossanitárias (FORSYTHE, 2005).

A contaminação microbiana em níveis elevados dos alimentos pode ocasionar doenças transmitidas por alimentos (DTA). Essas doenças são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

2.3 Legislação brasileira e limites microbiológicos para linguiça do tipo frescal

A Normativa n.º 4, de 31 de março de 2000 exige o cumprimento do Padrão de Qualidade e Identidade para a linguiça frescal. São estabelecidos parâmetros físico-químicos voltados ao teor máximo de umidade (70%) e gordura (30%), e os teores de proteína devem ser apresentados na forma de valor mínimo (12%). Cabe à indústria seguir os padrões de higiene e qualidade, em condições previstas pela legislação específica (BRASIL, 2000).

Para avaliar as condições higiênicossanitárias das linguiças frescas, a legislação brasileira estabelece a pesquisa dos seguintes microrganismos e os limites máximos permitidos: *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (ausência/25g), *Escherichia coli* (1×10^3 NMP/g) e aeróbios mesófilos (1×10^6 UFC/g) (BRASIL, 2019).

2.4 Uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na identificação de espécies de bactérias patogênicas

A técnica de PCR vem sendo utilizada para a detecção de diversos microrganismos. Desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis em 1985, esta técnica permite obter milhões de cópias de um segmento específico de DNA por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (primers) sobre um DNA molde. É realizada em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA (GANDRA et al., 2008).

O diagnóstico molecular via PCR representa redução de tempo de análise, aumento da confiabilidade e da especificidade e é de fácil aprendizagem. A rapidez na identificação do agente etiológico por meio da detecção do seu material genético, em comparação aos métodos bacteriológicos convencionais, faz com que a técnica de PCR se torne uma alternativa prática aos laboratórios de diagnóstico, uma vez que este método elimina o tempo de incubação, isolamento e testes bioquímicos em microrganismos de crescimento fastidioso, com poucas características bioquímicas

para identificação, como é o caso das bactérias do gênero *Campylobacter* (TEODORO et al., 2006).

A análise por PCR diminui o tempo de identificação e detecção de bactérias como a *Salmonella*, de dias para poucas horas, auxiliando as análises de rotina de laboratórios clínicos e industriais, facilitando também a detecção de organismos não adaptados ao cultivo convencional. Por ser uma técnica altamente específica, a PCR pode ser realizada utilizando o DNA cromossomal ou mesmo o DNA plasmidial, assim, sendo possível traçar o perfil genético de um organismo a partir de genes conhecidos e únicos para a espécie. A PCR não é vulnerável a reações atípicas e não depende de variações fenotípicas, evitando, assim, resultados falso-negativos fornecidos pela técnica microbiológica (DOUBLET et al., 2008).

Um dos fatores limitantes para a detecção de agentes microbianos por meio da PCR em amostras de alimentos, clínicas e ambientais, é a presença de substâncias as quais inibem ou reduzem a eficiência da amplificação, como sais biliares nas fezes, o grupo heme no sangue, substâncias húmicas no solo, proteinases no leite e ureia na urina. Por este motivo diferentes técnicas são empregadas para diminuir a inibição da PCR e/ou para separar as bactérias dos inibidores da PCR. Alguns fatores que podem inibir a eficiência da PCR podem ser reduzidos por meio da extração do DNA total da bactéria, apresentando assim resultados satisfatórios na análise de amostras com vários interferentes (SAMBROOK; RUSSELL, 2006).

3 JUSTIFICATIVA

As linguiças do tipo frescal destacam-se pela grande aceitação do consumidor brasileiro de todos os setores da sociedade e, além disso, apresentam baixo valor comercial, sendo um produto acessível, podendo ser encontrado em vários segmentos do mercado varejista. A falta de qualidade das carnes utilizadas na fabricação da linguiça frescal artesanal ou industrial, assim como a falta de rigor higiênico-sanitário em indústrias e açougues, podem contribuir para má qualidade microbiológica desse produto. As análises microbiológicas das amostras de linguiças de frango do tipo frescal coletadas na cidade de Brasília e região poderão determinar se esses alimentos estão sendo comercializados com segurança alimentar para o consumidor.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

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

4.2 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* e pesquisa de *Salmonella* spp.
- Realizar genotipagem por meio da técnica de PCR para confirmação de *Salmonella* spp.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas

Para as análises microbiológicas, foram coletadas oito amostras de linguças de frango do tipo frescal de diferentes marcas comerciais, dentro do prazo de validade e expostas ao consumo nos balcões refrigerados, em três diferentes supermercados do Distrito Federal no período de dezembro de 2020. Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas de cada embalagem. Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g 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^{-4}).

Para a contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de espalhamento em 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°C \pm 1°C por 7 dias para bactérias psicotróficas. Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes 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 contendo caldo verde brilhante foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h, e os tubos contendo caldo *Escherichia coli* em banho-maria a 45°C por 24 h. Para a contagem de *S. aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de espalhamento em superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Sal Manitol. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. As colônias isoladas suspeitas de *S. aureus* foram reisoladas em tubos de Agar Sal Manitol e identificadas por meio

da coloração de Gram. Os resultados obtidos das análises acima foram expressos em média de log UFC/g (bactérias mesófilas, bactérias psicotróficas e *S. Aureus*) ou média de log NMP/g (coliformes totais e coliformes termotolerantes).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada a 37°C por 24 h. Após a incubação, alíquotas do caldo de enriquecimento foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo selenito cistina. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, alíquotas de cada tubo foram semeadas, pela técnica de semeadura por esgotamento, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Salmonella Shigella (SS). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. no SS foram semeadas em tubos inclinados contendo o meio de cultivo Agar Três Açúcares e Ferro (TSI). Os tubos de TSI que apresentaram reações típicas de *Salmonella* foram submetidos às provas bioquímicas em Agar Lisina Ferro (LIA) e Agar Fenilalanina (FA). As cepas isoladas suspeitas de *Salmonella* spp. foram submetidas à identificação molecular por meio da técnica de PCR.

5.2 Identificação molecular *Salmonella* spp.

Para extração do DNA, as colônias isoladas foram inoculadas, individualmente, em caldo Luria Bertani (LB) 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 utilizadas na PCR foram 95°C por 2 min para desnaturação inicial; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min; 72°C por 10 min para a extensão final. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 1,25 µL de MgCl₂, 2 µL de dNTP (2,5 mM), 0,5 µL dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse* (10 µM), 0,4 µL de Taq DNA Polimerase (Cenbiot®, 5 U/µL), 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 etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®). Para a identificação de *Salmonella* spp. foi utilizado o fragmento de 298 pares de base referente ao gene *invA* (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência do primer e tamanho do produto amplificado na PCR para identificação do gene *invA*

Primer	Sequência 5´ - 3´	Produto amplificado	Bactéria
<i>invA foward</i>	CATTGGTGATGGTCTTGTCG	298 pb	<i>Salmonella</i> spp.
<i>invA reverse</i>	CTCGCCTTTGCTGGTTTTAG		

Fonte: Autoria própria (2021).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises microbiológicas das oito amostras de linguiça de frango do tipo frescal analisadas no presente estudo estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análises microbiológicas das amostras de linguiça de frango do tipo frescal

Amostras	Bactérias mesófilas (log UFC/g)	Bactérias psicrotróficas (log UFC/g)	Coliformes totais (log NMP/g)	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)	S. <i>aureus</i> (log UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.
1	7,5 ± 0,01	4,2 ± 0,10	1,9 ± 0,43	0,7 ± 0,20	ND	Ausência
2	6,2 ± 0,45	7,0 ± 0,17	3,1 ± 0,23	0,9 ± 0,45	ND	Presença
3	8,6 ± 0,23	7,4 ± 0,14	1,8 ± 0,92	ND	ND	Ausência
4	8,2 ± 0,37	7,9 ± 0,05	3,1 ± 0,01	0,7 ± 0,22	0,7 ± 0,99	Ausência
5	8,2 ± 0,15	7,8 ± 0,08	2,9 ± 0,28	0,2 ± 0,40	0,7 ± 0,99	Ausência
6	8,2 ± 0,06	7,7 ± 0,72	2,4 ± 0,80	1,1 ± 0,30	ND	Presença
7	3,9 ± 0,11	4,7 ± 0,11	2,6 ± 0,17	1,0 ± 0,99	ND	Ausência
8	6,7 ± 0,10	8,3 ± 0,20	3,1 ± 0,00	1,1 ± 0,99	1,3 ± 0,99	Presença

Nota: os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições; ND = não detectado.

Fonte: Autoria própria (2021).

A legislação brasileira (BRASIL, 2019) considera para produtos cárneos crus à base de carne moída ou picada de aves, como as linguiças frescas, um limite aceitável para bactérias mesófilas, valores que não excedam 6,0 log UFC/g. No total das 8 amostras de linguiça de frango analisadas neste estudo, 7 amostras (87,5%) apresentaram elevada contagem de microrganismos mesófilos com valores médios variando de 6,7 a 8,6 log UFC/g, e portanto, estavam impróprias para o consumo. A contagem de bactérias mesófilas nos alimentos ricos em proteínas é um indicador microbiológico, e a presença desses microrganismos fornece informações sobre a possibilidade de contaminação durante as etapas do processamento, o nível de deterioração e também sobre sua vida útil (OLIVEIRA SANTANA et al., 2019).

No estudo de Sharma et al. (2017) foi observado um aumento significativo da contagem de microrganismos mesófilos em linguiças de frango frescas durante o período de estocagem de 20 dias em temperatura de 4°C, sendo que até os 10 dias

de estocagem a contagem de microrganismos mesófilos se manteve abaixo de 6 log UFC/g e em 15 dias de estocagem essa contagem aumentou para 6,9 log UFC/g. Já no estudo de Serrano et al. (2018) das 39 amostras de linguiças frescas comercializadas na Suíça, 35 amostras (89,7%) apresentaram contagem de bactérias mesófilas maior que 6 log UFC/g.

Em relação as bactérias psicotróficas, a legislação brasileira (BRASIL, 2019) não exige um limite aceitável, entretanto, devido essas bactérias apresentarem bom desenvolvimento em temperaturas de refrigeração, sua presença está relacionada com a deterioração e diminuição da vida útil de alimentos refrigerados (BEZERRA et al., 2012). Neste estudo, 6 amostras (75,0%) apresentaram elevadas contagens com valores médios variando de 7,0 a 8,3 log UFC/g. Correia et al. (2014), ao avaliarem a variação das bactérias psicotróficas, mostraram um aumento da contagem de bactérias psicotróficas em linguiças frescas de 2,7-2,8 log UFC/g (no tempo zero de estocagem) para 8,6-9,6 log UFC/g (em 10 dias de estocagem) a 7°C, indicando deterioração do alimento.

A legislação brasileira (BRASIL, 2019) não estabelece um padrão microbiológico para enumeração de coliformes totais para a linguiça frescal, porém assim como as bactérias mesófilas e psicotróficas, este grupo é um indicador da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos (ALBERTI e NAVA, 2014; SERRANO et al., 2018). Neste estudo, 4 amostras (25,0%) apresentaram condições insatisfatórias de higiene pelo elevado número de coliformes totais (acima de 3,0 log NMP/g). No estudo de Silva et al. (2016) as amostras de linguiça frescal bubalina produzidas na Ilha do Marajó, Pará, apresentaram valores elevados de coliformes totais (acima de 3,0 log NMP/g), e segundo os autores, esses resultados indicaram falha no controle higiênico-sanitário no processo de elaboração.

Já para os coliformes termotolerantes, a legislação brasileira (BRASIL, 2019) estabelece um limite de 3,7 log NMP/g para a linguiça de frango frescal. A presença de coliformes termotolerantes é indicativa de contaminação fecal direta ou indireta no alimento, sendo *E. coli* a principal bactéria representante desse grupo (ALBERTI e NAVA, 2014; SOUZA et al., 2014). No nosso estudo, 7 amostras (87,5%) apresentaram coliformes termotolerantes, porém dentro dos limites aceitáveis (entre 0,2 e 1,1 log NMP/g).

Resultados semelhantes a este estudo foram reportados por Bezerra et al.

(2012), onde as 28 amostras de linguiça frescal analisadas encontraram-se dentro dos limites aceitáveis para coliformes termotolerantes. Porém, outros estudos reportaram contagens mais elevadas de coliformes termotolerantes em amostras de linguiças frescas. No estudo de Merlini et al. (2012), das 40 amostras de linguiça frescal analisadas, 20 amostras (50%) apresentaram excesso de coliformes termotolerantes e estavam impróprias para o consumo. No estudo de Alberti e Nava (2014), observou-se que das amostras de linguiça frescal obtidas em supermercados, 67% apresentaram valores insatisfatórios para coliformes termotolerantes. E no estudo de Souza et al. (2014), 16 amostras de linguiças frescas (40%) estavam inaceitáveis para o consumo devido ao excesso de coliformes termotolerantes.

As amostras deste estudo apresentaram uma baixa contagem de *S. aureus* (0,7-1,3 log UFC/g), sendo que a maioria das amostras (62,5%) não estava contaminada com bactérias *S. aureus*. O limite permitido pela legislação brasileira era de 3,7 log UFC/g (Brasil, 2001), porém com a recente atualização da legislação (Brasil, 2019) não existe mais um limite microbiológico para *S. aureus* nas linguiças frescas. No estudo de Valiatti et al. (2016), das 30 amostras de linguiças frescas analisadas, 2 amostras (6,7%) apresentaram contagem de *S. aureus* com valores acima de 3,7 log UFC/g. A presença de bactérias *S. aureus* nos alimentos indica falta de higiene do manipulador, pois essa bactéria está comumente presente na microbiota humana. A bactéria *S. aureus* é transmitida aos alimentos principalmente pelas condições inadequadas de higiene, possibilitando também contaminações cruzadas por contato com equipamentos, utensílios e com a matéria-prima. A presença elevada de bactérias *S. aureus* nos alimentos pode causar risco a saúde do consumidor, pois muitas cepas são produtoras de toxinas estafilocócicas termoresistentes (SERRANO et al., 2018; VALIATTI et al., 2016).

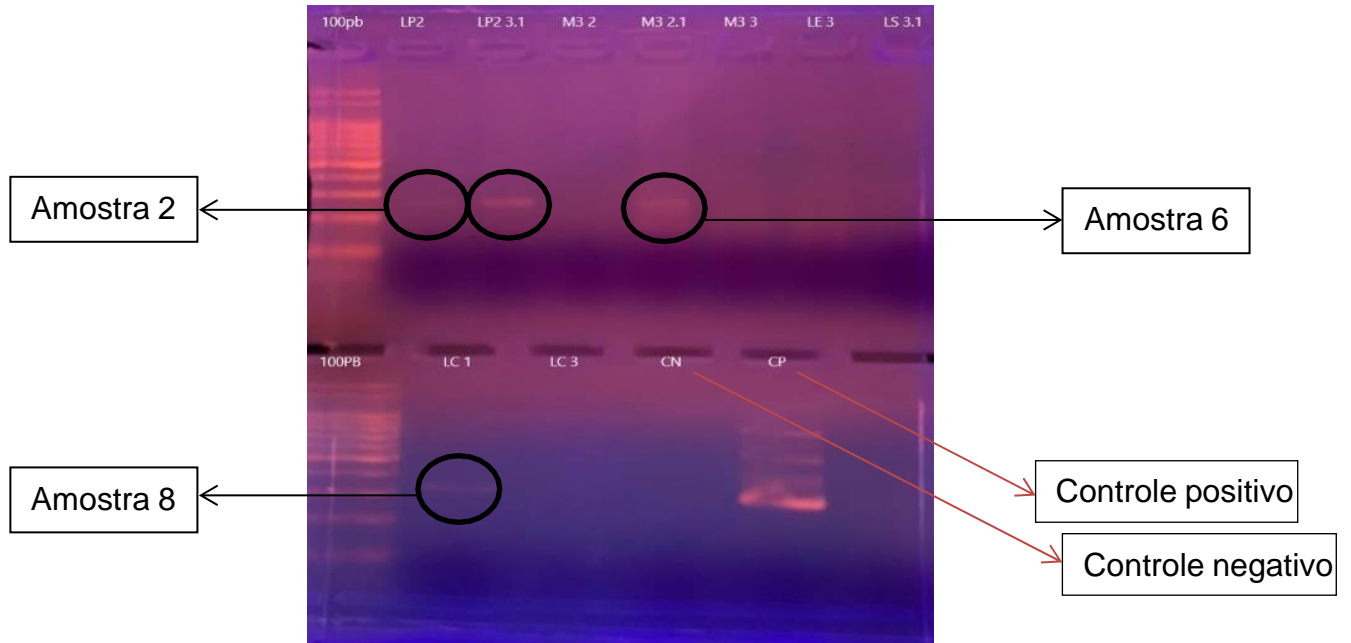
Correia et al. (2014) avaliaram o efeito da concentração de nitrito (50, 150 e 200 ppm) frente à contaminação por *S. aureus* em linguiças frescas armazenadas sob refrigeração a 7 e 12°C, e estocadas por 10 dias. Os resultados demonstraram que em 10 dias de estocagem as contagens de *S. aureus* foram elevadas, variando de 4,5 a 5,7 log UFC/g, mostrando que a temperatura e as concentrações de nitrito utilizadas não exerceram controle efetivo no desenvolvimento deste microrganismo. Os autores sugeriram que este produto seja armazenado sob temperaturas

inferiores a 7°C ou sob congelamento para maior estabilidade microbiológica.

A legislação brasileira (BRASIL, 2019) não permite a presença de *Salmonella* spp. em linguiças frescas. No presente estudo, 3 amostras (37,5%) estavam contaminadas com *Salmonella* spp. No estudo de Cabral et al. (2014) investigou-se a presença de *Salmonella* em 80 amostras de linguiças frescas de frango e de porco, e a positividade foi de 26%, sendo que os autores também utilizaram o gene *invA* para a confirmação molecular de *Salmonella* spp. Ainda nesse estudo, a embalagem original ou a embalagem nas bandejas de poliestireno realizada pelos supermercados não teve influência significativa nas taxas de contaminação dessas linguiças com *Salmonella*, sugerindo que a matéria prima contaminada e as práticas inadequadas de higiene durante o processo de fabricação são os principais fatores que aumentam a contaminação por *Salmonella*. No estudo de Cavalin et al. (2018), *Salmonella* spp. foi isolada em 28,3% das amostras de linguiças frescas de porco, e os autores sugeriram que a presença de *Salmonella* nessas amostras ocorreu devido a contaminação da planta de processamento e ou das matérias primas utilizadas na fabricação das linguiças. Valiatti et al. (2016) reportaram que das 30 amostras de linguiças frescas comercializadas em Ji-Paraná, RO, 6 amostras (20%) apresentaram *Salmonella* spp. A presença de *Salmonella* nos alimentos gera risco a saúde do consumidor, sendo essa bactéria entérica responsável por quadros frequentes de surtos de doenças alimentares no Brasil (DRAEGER et al., 2019).

As bactérias *Salmonella* foram confirmadas nas amostras de linguiças de frango por meio da identificação do gene *invA*, que contém sequências específicas para o gênero *Salmonella* (Figura 1). Este gene é reconhecido como padrão internacional para detecção de *Salmonella*. A presença do gene *invA* indica que a bactéria *Salmonella* possui um eficiente mecanismo de entrada e invasão do epitélio intestinal e essa invasão é um fator de virulência essencial no processo de infecção causado por tal patógeno (MOURA, et al., 2014; SHANMUGASAMY, et al., 2011).

Figura 1 - Gel de eletroforese mostrando a amplificação por PCR do gene *invA* identificado em cepas isoladas de três amostras de linguças de frango frescal



Fonte: Autoria própria (2021).

7 CONCLUSÕES

Os resultados do estudo mostraram que das 8 amostras de linguiça de frango analisadas, 7 amostras (87,5%) estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira, por apresentarem elevada contagem de microrganismos mesófilos ($> 6,0 \log \text{ UFC/g}$), sendo que dessas, 3 amostras (37,5%) também estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Pelo fato de as linguiças frescas serem um alimento amplamente consumido no Brasil, o processo produtivo desses alimentos deveria ser mais rigoroso em relação à qualidade das matérias primas, à higiene na produção e na manutenção da cadeia do frio. Com essas medidas, a contaminação microbiana pode ser minimizada, melhorando a qualidade desse produto.

O estudo apresenta uma limitação quanto ao baixo número de amostras analisadas, portanto, seria interessante confirmar os resultados supracitados analisando um maior número de amostras.

REFERÊNCIAS 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, Agência Nacional Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. **Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos**. 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-ndeg-60-de-23-de-dezembro-de-2019.pdf/view>

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, **Instrução Normativa SDA nº 4, de 31 de março de 2000** - Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada (CMS), de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha. DOU, 2000.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. Diário oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, nº7 p. 45-53, de 10 de janeiro de 2001.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p.70-76, 2005.

CAVALIN, P.B.B.; SARMIENTO, J.J.P.; KOBAYASHI, R.K.T.; NAKAZATO, G.; OCAÑA, A.N.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Detection of *Salmonella* spp. and diarrheagenic *Escherichia coli* in fresh pork sausages. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 4, p. 1533-1546, 2018.

CORREIA, L.M.M.; PEREIRA, J.G.; PINTO, J.P.A.N.; BARCELLOS, V.C.; BERSOT, L.S. Behavior of *Staphylococcus aureus* and autochthone microbiota in fresh sausages added of sodium nitrite and stored under refrigeration. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 10, p. 1880-1885, 2014.

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

DE OLIVEIRA SANTANA, Flávio Estefferson et al. MICRO-ORGANISMOS EM LINGUIÇA FRESCAL DE FRANGO COMERCIALIZADAS NA FORMA A GRANEL: UM FATOR DE RISCO A SAÚDE PÚBLICA. **I Congresso Internacional de Meio Ambiente e Sociedade**, Mossoró-RN, p. 3-4, 2019.

DOUBLET, B.; DOUARD, G.; TARGANT, H.; MEUNIER, D.; MADEC, J.Y.; CLOECKAERT, A. Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrugresistant strains. **Journal of Microbiological Methods**, v.75, n.2, p.359-361, 2008.

DRAEGER, C.L.; AKUTSU, R.C.C.A.; ZANDONADI, R.P.; DA SILVA, I.C.R.; BOTELHO, R.B.A.; ARAÚJO, W.M.C. Brazilian foodborne disease national survey: Evaluating the landscape after 11 years of implementation to advance research, policy, and practice in public health. **Nutrients**, v. 11, p. 2-10, 2019.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo: Artmed; 2005.

FRANCO, G. M. B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora: Atheneu, 2005.

GANDRA, E. A., GANDRA, T. K. V., MELLO, W. S., GODOI, H. S. G. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

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 12^o Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, São Paulo: Editora Blucher, 2014.

IGLESIAS, M. A. **Análise microbiológica de linguiça suína tipo frescal comercializada na cidade de Pelotas, RS, Brasil**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.

KIEDROWSKI, M.R.; KAVANAUGH, J.S.; MALONE, C.L.; MOOTZ, J.M.; VOYICH, J.M.; SMELTZER, M.S.; BAYLES, K.W.; HORSWILL, A.R. Nuclease modulates biofilm formation in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 1-16. 2011.

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.

MERLINNI, 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.

MOURA, M.S.; OLIVEIRA, R.P.; MELO, R.T.; MENDONÇA, E.P.; FONSECA, B.B.; ROSSI, D.A. Genes de virulência e diversidade genética em *Salmonella* spp. isoladas de amostras de origem suína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1367-1375, 2014.

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, **Food Science and Technology**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 736-742, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.

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. 5, p. 408 – 417, 2011.

SILVA, A. P. M. et al. Avaliação microbiológica da linguiça artesanal bubalina produzida na Ilha do Marajó, Pará, Brasil. **Scientia Plena** v. 12, n. 6, p. 1-6, 2016.

SERRANO, N. S., SWEIFEL, C., CORTI, S. STEPHAN, R. Microbiological quality and presence of foodborne pathogens in raw milk cheeses and raw meat products marketed at farm level in Switzerland. **Italian Journal of Food Safety**, v. 7, p. 110–115, 2018.

SHANMUGASAMY, M.; VELAYUTHAM, T.; RAJESWAR, J. InvA gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. **Veterinary World**, v. 4, n. 12, p. 562-564, 2011.

SHARMA, H.; MENDIRATTA, S.K.; AGARWAL, R.K.; KUMAR, S.; SONI, A. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of various essential oils in fresh chicken sausages. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 2, p. 279–292, 2017.

SILVA, A.P.M.; BIBIANO, J.N.; PORTAL, R.S.; SILVA, J.C.C.; NEVES, I.D.L.; FIGUEIREDO, E.L. Avaliação microbiológica da linguiça artesanal bubalina produzida na Ilha do Marajó , Pará , Brasil. **Scientia Plena**, v. 12, n. 06, p. 1–6, 2016.

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.

TEODORO, V. A. M.; PINTO, M. C. D.; VANETTI, P. D.; BEVILACQUA, M. P.; PINTO, M. S. Aplicação da técnica de PCR na detecção de *Yersinia enterocolitica* em suínos abatidos sem inspeção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 9-14, 2006.

VALIATTI, T.B.; BARCELOS, I.B.; CALEGARI, G.M.; SILVA, W.M.C.; ALMEIDA, F.K. V.; PRAZERES, P.F.L; SOBRAL, F.O.S.; ROMÃO, N.F.; GASPAROTTO, P.G.H. Avaliação microbiológica de linguiças tipo frescal comercializadas em supermercados do município de Ji-Paraná, Rondônia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 14, n. 2, p. 678–686, 2016.