

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO



Trabalho de Conclusão de Curso

**Análise microbiológica de doces confeitados comercializados na  
cidade de Pelotas-RS, Brasil**

**Melina da Silva Mesquita Gomes**

Pelotas, 2010

MELINA DA SILVA MESQUITA GOMES

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE DOCES CONFEITADOS,  
COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE PELOTAS, RS, Brasil.**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gladis Aver Ribeiro

PELOTAS

Rio Grande do Sul . Brasil

Novembro de 2010

## Banca Examinadora

Prof. Dr<sup>a</sup>. Gladis Aver Ribeiro

Prof. Dr. Eduardo Bernardi

Prof. Dr<sup>a</sup>. Anelise Vicentini Kuss

*Dedico  
À minha família.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares em especial meus pais, Lionei e Elizabeth, pelo apoio e incentivo, nos momentos complicados e de incerteza na minha vida;

As minhas irmãs Natália e Letícia, pela amizade, companheirismo, momentos de descontração e alegrias que me proporcionaram;

A minha filha Eduarda, que me apoiou em todos os momentos, entendendo minha ausência quando tive que estudar, fazer trabalhos etc. Acima de tudo, sempre ao meu lado, me ensinando e aprendendo comigo, indo comigo para o laboratório nas férias, querendo estar por dentro da minha área de pesquisa, sempre se fazendo presente, nem sempre fisicamente.

Ao meu namorado Michel, por sempre estar ao meu lado, quando o desespero chegava e me incentivando incansavelmente quando estava desanimada.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Gladis Aver Ribeiro, pela paciência, amizade e incentivo à pesquisa;

Aos funcionários do departamento de Microbiologia e Parasitologia, em destaque Luis Carlos e Isaias que sempre me ajudaram quando precisei, sem medir esforços.

A colega de laboratório Rosana que me auxiliou a dar os meus primeiros passos dentro do laboratório de Microbiologia; As colegas de laboratório Igor, Anelise e Lisiane pela paciência e companheirismo;

A minha amiga e colega Mariana, pela amizade, incentivo, companheirismo, descontração em todos os momentos durante os cinco anos de graduação, agüentar os momentos difíceis e sempre estar pronta aos meus chamados;

A todos que me incentivaram direta ou indiretamente, para realização da graduação e finalmente deste trabalho.

"... Só é digno de chegar ao pódio, quem é digno da sua luta..."

## **Análise microbiológica de doces confeitados, comercializados na cidade de Pelotas, RS, Brasil.**

### **RESUMO**

A contaminação microbiana dos alimentos é um dos principais problemas de saúde pública atualmente. Quando se considera a qualidade microbiológica de alimentos, freqüentemente se utiliza a pesquisa de microrganismos indicadores que, quando presentes, podem fornecer informações sobre o nível de sua contaminação e as condições higiênico-sanitárias durante o processamento, produção ou armazenamento. As práticas de manipulação seguras dos alimentos são os mais prováveis meios para preservar os padrões de qualidade dos produtos, além de permitir que se usufrua mais dos seus benefícios nutricionais. Este trabalho teve o objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias dos doces comercializados em docerias e feiras livres, na cidade de Pelotas, através da pesquisa de bactérias indicadoras e patogênicas como *Staphylococcus* coagulase positivo, Coliformes termotolerantes com identificação de *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Bacillus cereus*. Os resultados demonstraram que das 60 amostras analisadas, 18 (30%) estavam contaminadas por Coliformes termotolerantes com presença de *E. coli* em 17 (94%) destas, *Bacillus cereus* esteve presente com níveis acima do permitido em 11 (18%) amostras, e *Staphylococcus* coagulase positiva em 8 (13%). A presença de *Salmonella* spp foi constatada em uma (2%) amostra. Concluiu-se que , é indispensável uma vigilância sanitária mais severa para diminuir a contaminação dos doces, tornando-o seguro ao consumidor.

Palavras-chaves: Bactérias, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, Contaminação de Alimentos, Docerias.

## Abstract

GOMES, Melina da Silva Mesquita. **Microbiological analysis of confectionery sweets sold at the city of Pelotas, RS.**

The microbiological contamination of food is one of the main public health problems today. When we consider food's microbiological quality, researches of indicator microorganisms that, when present, can provide information about the contamination level and hygienic-sanitary conditions during the processing, production and storage are often used. The safe manipulation practices of food are the most probable means to preserve the quality standards of the products, thus allowing a better use of the nutritional benefits. The objective of this work is to evaluate the hygienic-sanitary conditions of confectionery sweets sold on sweet markets and free markets, at the city of Pelotas, through the research of bacteria such as: Coagulase-positive *Staphylococcus*, heat tolerant coliforms with the identification of *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Bacillus cereus*. The results showed that from 60 samples analyzed, 18 (30%) was contaminated by thermo tolerant coliforms with the presence of *Escherichia coli* in 17 (94%) of those, *Bacillus cereus* above the allowed level in 11 (18%) samples, and coagulase positive *Staphylococcus* in 8 (13%). The presence of *Salmonella* spp was verified in one (2%) sample. It was concluded that is indispensable a more severe sanitary vigilance to lower the sweets contamination, becoming healthy and secure for the consumer.

Key words: Bacteria, Coagulase-positive *Staphylococcus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, Food Contamination, Sweet Market.



## Lista de Figuras

Figura 1	Placa de Baird Parcker com colônias negras com halo transparente, características se <i>Staphylococcus</i> spp.....	25
Figura 2	Teste de coagulase positivo para confirmação de <i>Staphylococcus</i> spp.	26
Figura 3	Placa de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), apresentando colônias mucóides com brilho metálico, características de <i>Escherichia coli</i> .....	27
Figura 4	Placa de Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), com colônias negras, características de <i>Salmonella</i> spp.....	28
Figura 5	Placa de Ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP), apresentando colônias opacas, secas e com presença de halo características de <i>Bacillus cereus</i> .....	29
Figura 6	Índice de contaminação encontrada no Doce I (Trouxinha de Chocolate), comercializados na cidade de Pelotas-RS.....	31
Figura 7	Índice de contaminação encontrada no Doce II (Beijo de Alemão), comercializados na cidade de Pelotas-RS.....	31
Figura 8	Índice de contaminação encontrada no Doce III (Panelinha de coco com ovos), comercializados na cidade de Pelotas-RS.....	32
Figura 9	Contaminação bacteriana nos doces comercializados em quatro estabelecimentos da cidade de Pelotas-RS.....	32
Figura 10	Presença de <i>Bacillus cereus</i> nas amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas-RS.....	33
Figura 11	Presença de Coliformes termotolerantes nas amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas-RS.....	35
Figura 12	Presença de <i>Escherichia coli</i> nas amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas-RS.....	36
Figura 13	Presença de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva nas amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas-RS.....	37
Figura 14	Presença de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas-RS.....	39

## Sumário

RESUMO.....	6
ABSTRACT .....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
1. INTRODUÇÃO .....	10
2. OBJETIVO.....	12
3. JUSTIFICATIVA.....	13
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
4.1 Qualidade e Segurança Alimentar .....	14
4.2 Manipuladores de alimentos.....	16
4.3 Alimentos artesanais .....	18
4.4 Microrganismos indicadores.....	19
4.4.1 Coliformes Termotolerantes .....	19
4.5 Microrganismos patogênicos.....	19
4.5.1 <i>Escherichia coli</i> .....	20
4.5.2 <i>Bacillus cereus</i> .....	21
4.5.3 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	21
4.5.4 <i>Salmonella</i> spp.....	23
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
5.1 Coleta e procedimento das análises.....	24
5.2 Isolamento de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	24
5.3 Isolamento de Coliformes Termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> .....	26
5.4 Isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	27
5.5 Isolamento de <i>Bacillus cereus</i> .....	28
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO .....	30
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS.....	41
9. ANEXOS .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

A partir do momento em que o homem começou a elaborar seu próprio alimento, além das preocupações com o sabor dos mesmos, também se preocupou com as doenças por eles veiculadas. Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) ou Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são termos utilizados para designar enfermidades causadas pela ingestão de microrganismos viáveis (infecção) ou toxinas por eles produzidas (intoxicação) em quantidades suficientes para o desenvolvimento de quadro patológico (ANVISA, 2001). As DVAs representam um importante problema de saúde pública, pois se estima que atinjam milhões de pessoas no mundo, sendo que a maioria dos casos está ligada às condições da matéria prima utilizada no preparo, aos maus hábitos de higiene dos manipuladores, à higienização e controle sanitário do ambiente em que são preparados (NOLLA; CANTOS, 2005).

O preparo e comércio dos alimentos por ambulantes nas ruas das cidades é um fenômeno de ocorrência mundial e tem especial importância nos países em desenvolvimento, onde constitui uma atividade econômica alternativa para os desempregados (ARAMBULO et al., 1994). Em contraponto, este tipo de comércio pode constituir um risco à saúde da população, pois os alimentos podem ser facilmente contaminados com microrganismos patogênicos (SILVA JR., 1995).

Alimentos comercializados em lanchonetes, quiosques ou por vendedores ambulantes são considerados propícios à contaminação microbiológica, constituindo-se em risco à saúde da população devido a condições inadequadas de manuseio, preparo e falta de conhecimento técnico, além da ausência de fiscalização sanitária efetiva (NASCIMENTO et al., 2003, RODRIGUES et al., 2001). Os alimentos obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de se apresentarem contaminados, devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados e contaminados, elaboração e manuseio em condições impróprias, e ainda o armazenamento e comercialização em temperatura inadequada, que são fatores que contribuirão para aumentar o risco de causarem enfermidades (DUARTE et al., 2005). Desta forma, é importante conhecer as

variáveis que podem comprometer a qualidade e segurança alimentar (GÓES et al., 2001; NASCIMENTO, et al., 2003; RODRIGUES et al., 2001).

Quando se considera a qualidade microbiológica de alimentos, freqüentemente se utiliza a pesquisa de microrganismos indicadores que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre o nível de sua contaminação e as condições higiênico-sanitárias durante o processamento, produção ou armazenamento aos quais esses alimentos foram submetidos (ANVISA, 2001).

## 2 OBJETIVOS

- Verificar a ocorrência de Coliformes termotolerantes e identificação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp., em doces confeitados comercializados em docerias e feiras livres na cidade de Pelotas, RS, Brasil.
- Determinar, nas amostras positivas, se a carga bacteriana indica alimento impróprio para o consumo.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Devido ao fato de Pelotas ser popularmente conhecida como a Cidade Nacional do Doce, a análise microbiológica destes alimentos é fundamental para se conhecer as condições de higiene nas quais são preparados e vendidos, bem como a capacidade destes alimentos veicularem microrganismos potencialmente patogênicos.

## **4 REVISÃO DE LITERATURA**

A humanidade, desde seu passado mais remoto, tem se preocupado com os fatores que afetam sua qualidade de vida e sua saúde. Alimento, abrigo e fonte de renda constituem os recursos básicos para a saúde e encontram-se na base da hierarquia de necessidades do homem (GERMANO, 2003). A saúde é um direito inalienável de todo cidadão, mas para que isso ocorra é fundamental que os alimentos sejam produzidos em quantidade e com qualidade apropriadas ao equilíbrio orgânico, o qual representa um fator de resistência às doenças (GERMANO; GERMANO, 2003).

Alimento seguro é aquele que, além de apresentar as propriedades nutricionais esperadas pelo consumidor, não lhe causa danos à saúde e não lhe tira o prazer que o alimento deve lhe oferecer. Pressupõe-se, portanto, ausência de contaminações que possam afetar a saúde dos consumidores (GERMANO, 2003). Apesar das indústrias e órgãos reguladores trabalharem pela produção e sistemas de processamentos que garantam que todos os alimentos sejam seguros e saudáveis, a isenção completa de riscos é um objetivo inatingível. A segurança e a saúde estão relacionadas a níveis de risco que a sociedade considera razoáveis em comparação com outros riscos da vida cotidiana (FORSYTHE, 2002).

### **4.1 Qualidade e segurança alimentar**

O fator segurança alimentar cada vez mais se torna uma questão básica nas decisões estratégicas. A segurança alimentar é fundamental para o desenvolvimento de sistemas que promovem a saúde do consumidor. Além de atender as exigências legais também garantem a qualidade do alimento (PIRAGINE, 2005). Porém, a dificuldade em produzir um alimento seguro baseia-se no fato de que a população de consumidores é bastante diversificada, com vários graus de sensibilidade e estilo de vida (FORSYTHE, 2002). Para as pessoas, a palavra higiene significa limpeza. Se algo parece limpo então pensam que também é higiênico. A definição para higiene alimentar é a destruição total ou parcial de microrganismos prejudiciais do alimento por meio de aquecimento e outras práticas (PIRAGINE, 2005).

Entende-se por toxinfecção alimentar as doenças microbianas de origem alimentar, que podem ser subdivididas em duas grandes categorias: intoxicação alimentar, causada pela presença de uma toxina bacteriana formada no alimento, e, infecção alimentar, causada pela entrada de bactéria no organismo através da ingestão de alimentos contaminados e conseqüente reação orgânica pela presença de bactérias ou de seus metabólitos (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Foi no início do século XX que as bactérias foram reconhecidas como agentes de toxinfecções alimentares e de outras doenças de origem alimentar (HOBBS; ROBERTS, 1993). Existe um grande número de fatores que contribuem para tornar um alimento inseguro, causando toxinfecções àquelas pessoas que os ingerem (FORSYTHE, 2002). Os sintomas apresentados pelas gastroenterites são diarreia, náuseas, vômitos ou febre, sendo que algumas pessoas podem não reconhecer essas enfermidades como causadas por bactérias ou outros patógenos em alimentos. Cabe ressaltar que a diarreia constitui a maior causa de morbidade e mortalidade em recém-nascidos e crianças de até cinco anos (SIQUEIRA et al., 2006).

Preparar alimentos dentro de padrões higiênicos satisfatórios é uma das condições essenciais para promover e manter a saúde, sendo que a deficiência nesse controle pode resultar a ocorrência de surtos de DVAç (OLIVEIRA; SILVA, 2003).

Carvalho (2005), considera os alimentos contaminados por bactérias patogênicas indesejáveis sob o aspecto de saúde pública, visto que estes representam risco a saúde do consumidor, especialmente em populações debilitadas. Segundo Jay (2005), os cinco fatores mais freqüentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares são refrigeração inadequada, alimentos preparados com muita antecedência, manipuladores infectados com hábitos de higiene pessoal deficientes, cozimento ou processamento inadequado e a manutenção de alimentos sob aquecimento em temperaturas não seguras.

Embora as estatísticas brasileiras sejam precárias, acredita-se que a incidência de DTAs em nosso país seja bastante elevada. Mesmo em países desenvolvidos, nos quais o abastecimento de alimentos é considerado seguro do ponto de vista de higiene e saúde pública, a ocorrência de doenças desta natureza é significativa e vem aumentando, apesar dos avanços tecnológicos nas áreas de produção e controle de alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2006).



A análise microbiológica dos alimentos para se verificar a presença de microrganismos é fundamental para se conhecer as condições de higiene nas quais estes alimentos foram preparados (BRUM, 2001), visto que a maior parte das intoxicações alimentares resulta de manuseio inadequado dos alimentos (PANETTA, 1998).

#### **4.2 Manipuladores de alimentos**

Entende-se por manipulador de alimentos, qualquer pessoal do serviço de alimentação que entra em contato direto ou indireto com o alimento desde a fonte até o consumidor (BRASIL, 2004). É importante ressaltar que certas condições de saúde podem determinar que as pessoas se tornem desqualificadas, permanentemente, para exercerem o trabalho de manipuladores (OLIVEIRA et al., 2003).

As práticas de manipulação segura dos alimentos são os mais prováveis meios para preservar os padrões de qualidade dos produtos, além de permitir que se usufrua mais dos seus benefícios nutricionais (FIGUEIREDO, 2002). A higiene pessoal dos manipuladores, a higiene do ambiente de trabalho e dos utensílios utilizados para o preparo dos alimentos, são itens imprescindíveis para obtenção de uma alimentação sem contaminação e de boa qualidade (BRASIL, 1997).

É recomendado ao manipulador que não trabalhe na área de manipulação de alimentos se apresentarem diarreia, doenças infecto-contagiosas, feridas ou inflamações na pele que possam contaminar o ambiente ou outros manipuladores. Devem observar cuidados especiais com as mãos porque representa uma grande fonte de contaminação dos alimentos, as unhas devem ser mantidas curtas, limpas e sem qualquer tipo de esmalte. Deve lavar bem com água e sabão neutro, desinfetar as mãos e os braços até a altura dos cotovelos, antes do início dos trabalhos, e toda vez que mudar de atividade durante o trabalho, imediatamente após o uso do banheiro, se fumar, manipular lixo ou restos de alimentos e todas as vezes que for necessário (BRAGANÇA, 2001). Os cabelos devem ser mantidos limpos e penteados sempre. Utilizar uma proteção adequada seja touca ou rede, de modo a cobrir inteiramente os cabelos e evitar sua queda sobre os alimentos. No caso de bigode e barba é preciso ter cuidado, para evitar que sirvam de fonte de contaminação dos alimentos, sendo melhor não apresentá-los (BRAGANÇA, 2001).

A microbiota das mãos e roupas pode ser oriunda do solo, água, poeira e outros ambientes. Outras fontes importantes são as fossas nasais, a boca e a pele. Em condições muito precárias de higiene, os microrganismos do trato gastrointestinal também podem contaminar as mãos dos manipuladores e, conseqüentemente, os alimentos por eles preparados (FRANCO; LANDGRAF, 2006). Não se deve manipular dinheiro e alimentos simultaneamente, porque o dinheiro é um elemento contaminante. Se for inevitável, deverá lavar as mãos antes de voltar a manipular os alimentos (BRAGANÇA, 2001).

A Organização Mundial de Saúde relata que 60% das doenças de origem alimentar são provocadas por microrganismos, os quais o manipulador é o principal veículo de transmissão (SILVA JR, 1995). De fato, eles exercem uma função importante na segurança alimentar por poderem introduzir patógenos nos alimentos durante a produção, processamento, distribuição e o preparo. A presença de microrganismo patogênico nas mãos representa grande importância epidemiológica, devido à possibilidade de transferência cruzada para os alimentos (NAVARRO, 2000). CURTIS (2000) encontraram *E. coli* nas mãos de 21,9% dos manipuladores de um restaurante em Caracas, Venezuela. Já no estudo realizado por CARDOSO (1999), foi encontrada uma porcentagem superior de *E. coli* (97,3%) em mãos de manipuladores de restaurantes da Bahia.

O aumento do número de ambulantes que comercializam alimentos proporciona condições favoráveis para o aumento do risco de intoxicações alimentares, partindo do pressuposto que as condições de higiene e manipulação dos alimentos possam ser deficientes (SOTO et al., 2008).

### **4.3 Alimentos artesanais**

Alimentos artesanais são aqueles que mantêm as características tradicionais, culturais ou regionais: seja nos processos de elaboração de alimentos que se transmitem de geração em geração, conforme a tradição cultural, ou que utilizam matérias primas produzidas na região. A origem da tradição doceira em Pelotas remonta o ciclo do charque, que foi um período dos mais pródigos na história rio-grandense. Foram os novos barões, a elite de emergentes da época, que trouxeram os costumes dos parentes lusitanos e dos senhores de engenho do nordeste (MAGALHÃES, 2001). Com o fim das charqueadas e com a chegada dos

imigrantes alemães, italianos e franceses em meados do século XIX, novas etnias passaram a conviver no mesmo espaço possibilitando a troca de costumes e tecnologias. É nessa época que se intensifica o plantio de frutas de clima temperado como pêssego, maçã, figo, marmelo e pouco depois a utilização dessas frutas na forma de compotas, doces de massa, passas e cristalizados (MAGALHÃES, 2001).

As tradicionais receitas de doces trazidas por esses imigrantes foram aperfeiçoadas, através dos tempos, pelos seus descendentes. Cada família inventava a sua receita, adicionando uma pitada do gosto pessoal, uma colher de produtos locais. Assim foram criadas essas maravilhas, segredos guardados a sete chaves pelas famílias doceiras. Essa mistura cultural fez com que Pelotas seja conhecida como a Capital Nacional do Doce (PREFEITURA MUNICIPAL DE PELOTAS, 2001 *apud* CANEVER, 2004).

Na Produção de alimentos artesanais, destacam-se os doces, biscoitos, suspiro, cequilha, raiva, rosquinha, bem casado, queijos, rapaduras temperadas, castanha de cajú, licores e lambedores.

Os doces artesanais de Pelotas são integrantes do patrimônio cultural do Estado devido a aprovação do projeto de Lei 201/2003, de autoria da deputada estadual Leila Fetter (PP), este projeto foi sancionado pelo governador Germano Rigotto tornando-se a Lei n 11.919 (FETTER, 2003).

O segmento doceiro artesanal de Pelotas (composto pelas fábricas artesanais, docerias e confeitarias) responde por um faturamento anual estimado em R\$ 7 milhões, sendo que as vendas ocorrem principalmente no mercado local (40%), nas demais regiões do estado (40%) e nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo, etc, (20%). Estima-se um comércio mensal de 150.000 unidades de doces. A demanda de mão-de-obra nos períodos de pico alcança cerca de cinco mil pessoas ao longo de toda a cadeia (RIO GRANDE DO SUL, 2000).

#### **4.4 Microrganismos indicadores de contaminação**

O termo indicador pode ser aplicado a qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico de microrganismos, cuja presença ou ausência proporciona uma evidencia indireta referente a uma característica particular do histórico da amostra, como contaminação fecal (FORSYTHE, 2002).

#### 4.4.1 Coliformes Termotolerantes

Coliformes são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2006)

São bactérias definidas como bastonetes Gram-negativos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos, que fermentam lactose e formam gás em 48 horas após terem sido colocados em caldo lactosado a 35°C (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). O grupo inclui cerca de quatro gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*, os quais fazem parte da microbiota gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente. O gênero *Escherichia* é representado apenas por *Escherichia coli*, a qual indica contaminação fecal, enquanto os demais gêneros possuem origem não fecal. Por esse motivo, a presença de coliformes termotolerantes em alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *E. coli*. Por essa razão, sua presença em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas inadequadas de alimentos (SILVA JR, 1995).

#### 4.5 Microrganismos patogênicos

Os microrganismos que podem causar as doenças veiculadas por alimentos são denominados patogênicos e podem afetar tanto o homem quanto os animais (FIGUEIREDO, 2002). As características das doenças que esses microrganismos causam dependem de uma série de fatores inerentes ao alimento, ao microrganismo patogênico em questão e ao indivíduo a ser afetado. Estes podem chegar até o alimento por inúmeras vias, sempre refletindo condições precárias de higiene durante produção, armazenamento, distribuição ou manuseio em nível doméstico (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Microrganismos patogênicos, como *Salmonella*, são motivos de preocupação por parte de órgãos responsáveis pela qualidade dos alimentos e segurança dos consumidores. Em 1996 em Brasília, um surto de salmonelose foi investigado por Oliveira e INHAN al. (1998), confirmando que um bolo ingerido durante uma festa havia sido o responsável pela enfermidade, em função da contaminação existente no glacê, elaborado com ovos crus. Segundo Granada et al. (2003), no Estado de São Paulo, foi realizado um levantamento dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos, no período de 1994 a 1998, sendo constatado que os principais alimentos envolvidos eram: carnes e derivados, aves e derivados, peixes e derivados, produtos de confeitaria, pratos prontos para consumo, leite e derivados, amiláceos e outros (não enquadrados nas classes anteriores). Também foi verificado que os patógenos mais freqüentes foram: *Estafilococos* coagulase positiva (43,7%), *Salmonella* spp. (33,5%) e *Bacillus cereus* (16,2%).

#### **4.5.1 *Escherichia coli***

Durante a maior parte do século XX, a indústria de alimentos considerou a contaminação por *E. coli*, meramente, como um problema relacionado a práticas insatisfatórias de higiene. Na atualidade, dentre os agentes de doenças transmitidas por alimentos, *E. coli* passou a merecer especial atenção da indústria de produtos alimentícios, das autoridades de saúde e, também, da própria sociedade, todos preocupados com suas graves conseqüências (GERMANO; GERMANO, 2003), já que foi encontrada em diversos alimentos: queijo (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001), quindim (ROLL; 2002), produtos cárneos (SILVA; SOUZA, SOUZA 2004), leite cru e pasteurizado (CATÃO; CEBALLOS, 2001).

A *E. coli* é uma enterobactéria Gram-negativa, não esporogênica. Não apresenta termoresistência, sendo destruída a 60°C, em poucos segundos, mas capaz de resistir por longo tempo em temperaturas de refrigeração (GERMANO; GERMANO, 2003). Metaboliza uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos. Produz catalase, utiliza glicose, amônia e nitrogênio como fontes de carbono (BRASIL, 2001).

O principal habitat de *E. coli* é o trato intestinal dos humanos e de outros animais de sangue quente. A maioria dos sorogrupos de *E. coli* faz parte da flora comensal do intestino dos mamíferos. No entanto, certos sorotipos são patogênicos

para o homem e para outros animais e estes não são considerados como fazendo parte da flora intestinal normal (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

O período de incubação das gastroenterites por *E. coli* é de 12 horas a três dias e os sintomas consistem principalmente em diarreia, algumas vezes com presença de sangue e muco nas fezes (HOBBS; ROBERTS, 1993).

#### **4.5.2 *Bacillus cereus***

O *Bacillus cereus* é um bacilo Gram-positivo, formador de endoesporos, e geralmente considerado inofensivo. Contudo, ele foi intensificado como causa de surtos de DVAs (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Foi isolado de uma variedade de alimentos, sendo que a frequência de intoxicação alimentar causada por este microrganismo, aumentou nos últimos anos (KONEMAN et al., 2001). No Brasil, *B. cereus* tem sido isolado de vários tipos de alimentos, tais como: queijos, farinhas, amidos, cereais (BRUM, 2001), alimentos desidratados e carne moída, (FRANCO; LANDGRAF, 2006). Sua presença em um alimento em quantidade superior a  $10^6$  organismos por grama é um indício de multiplicação do agente e constitui um fator de elevado risco à saúde (GERMANO; GERMANO, 2003).

Existem dois tipos reconhecidos de toxinfecções alimentares causadas por este patógeno: o diarreico e o emético. Ambos são autolimitantes, e a recuperação ocorre dentro de 24 horas. Os sintomas da intoxicação diarreica são diarreia aquosa, dores abdominais, náuseas e raramente vômitos, enquanto os sintomas da intoxicação emética são náuseas, vômitos e dores abdominais com possibilidade de diarreia (FORSYTHE, 2002).

O controle de *B. cereus* em alimentos fundamenta-se na prevenção de seu desenvolvimento, uma vez que é difícil, senão impossível, impedir-se por completo a sua presença nas matérias-primas. Nestas condições, é fundamental que, nos alimentos preparados e prontos para o consumo, a multiplicação intensa da bactéria seja inibida, quer pela refrigeração adequada ou pela manutenção dos alimentos em temperaturas acima de 55°C (GERMANO; GERMANO, 2001 *apud* SOTO et al., 2005).

#### 4.5.3 *Staphylococcus coagulase positiva*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, imóveis e não formadoras de esporos (SILVA; GANDRA, 2004). Existem no ar, na poeira, no esgoto, na água, no leite e nos alimentos como: pizza (BLUME, 2007), rapadura (BLUME; RIBEIRO 2007), doce de ninho (ROLL, 2002); (ARAÚJO et al., 2004), queijo (ASSUMPÇÃO et al., 2003), ou equipamentos de processamento de alimento, nos seres humanos e nos animais, sendo ambos os principais reservatórios. Estão presentes nas vias nasais e na garganta, além do cabelo e pele de 50% ou mais dos indivíduos saudáveis (FORSYTHE, 2002), sendo assim a manipulação do alimento pelo homem já indica uma provável fonte de contaminação (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

Uma das principais causas de gastroenterites é a intoxicação estafilocócica, causada pela ingestão de uma enterotoxina produzida por algumas cepas deste microrganismo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Portanto, o agente causal não é a bactéria, mas sim várias toxinas produzidas pela mesma (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

A presença de *Staphylococcus coagulase positiva* em alimentos processados é interpretada como indicativa de contaminação pelos manipuladores, bem como de limpeza e sanificação inadequadas de superfícies e de utensílios, materiais e equipamentos (ICMSF, 1985). A coagulase é uma enzima extracelular que coagula o plasma sanguíneo e que é muito utilizada na rotina de testes para identificação do microrganismo em laboratório. Por conta das semelhanças entre as espécies de *Staphylococcus* spp. houve uma mudança na legislação brasileira, que passou a estabelecer a pesquisa e enumeração de *Staphylococcus coagulase positiva* ao invés da enumeração de *S. aureus* (SILVA, SOUZA e SOUZA, 2004).

A dose tóxica mínima de enterotoxina, capaz de provocar a manifestação clínica da intoxicação estafilocócica é inferior a 1,0 mg (GERMANO; GERMANO, 2003). A doença geralmente dura 2 ou 3 dias (FORSYTHE, 2002), os sintomas que aparecem dentro de 1-6 horas após a ingestão do alimento, são caracterizados por náuseas, vômito, espasmo abdominal e diarreia. A intoxicação estafilocócica pode ser fatal em recém-nascidos e pessoas idosas (RADDI, LEITE e MENDONÇA, 1988).

Os *Staphylococcus* spp. podem ser destruídos pelo calor, sendo mais eficiente uma temperatura não muito alta (65°C) por um tempo longo (30q, porém a toxina por eles formada é termorresistente (RIEDEL, 2005), não podendo ser inativada por regimes de cocção padrão. Por isso, evitando a contaminação do alimento pelo microrganismo e mantendo-o a baixas temperaturas, a carga microbiana pode ser limitada (FORSYTHE, 2002).

#### **4.5.4 *Salmonella* spp.**

São bastonetes Gram-negativos, anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos. Amplamente distribuídos pela natureza, tendo seu habitat normal o trato intestinal de seres humanos e de animais de sangue quente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). *Salmonella* spp. são bastantes resistentes ao calor, à desidratação e se multiplicam em baixas temperaturas. Daí a sua grande importância na presença de alimentos manipulados (RIEDEL, 2005): doces (ARAÚJO, 2003), ovos (OLIVEIRA, 2003).

As infecções causadas por *Salmonella* spp., família Enterobacteriaceae, são consideradas na atualidade como as mais importantes causas de DTAs (GERMANO; GERMANO, 2003). A *Salmonella* spp. é um dos microrganismos mais envolvidos em casos e surtos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive o Brasil, embora muitos casos não sejam notificados (SIQUEIRA et al., 2006). A sua patogenicidade varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro.

Todas as espécies *Salmonella* são consideradas patogênicas em algum grau (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). As doenças causadas costumam ser divididas em: febre tifóide, febre entérica e enterocolite ou salmonelose e os sintomas aparecem em média, 12 a 36 horas após o contato com o microrganismo, durando entre um a quatro dias e tendo como características diarreia, febre, dores abdominais e vômitos (BLUME, 2007).



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Coleta e procedimentos das análises

As amostras de doces foram obtidas em duas feiras livres e duas docerias, sorteadas aleatoriamente, do centro da cidade de Pelotas-RS e transportadas na própria embalagem para o laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMP), do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), onde foram feitas as análises microbiológicas. Foram analisados doces dos tipos Panelinha de coco com ovos, Beijo de alemão e Trouxinha de chocolate, oriundos de quatro locais diferentes, com cinco repetições, totalizando um número de 60 amostras.

Para todas as análises foi usada a metodologia baseada em Silva; Junqueira e Silveira (1997) onde determina pesar 25g de cada amostra e homogeneizá-la com 225 mL de água peptonada 0,1% e a partir disso realizar diluições decimais seriadas para determinação do Número Mais Provável (NMP) de bactérias por grama de alimento, para verificação e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva, Coliformes totais e termotolerantes e *Escherichia coli*.

Para identificação de *Salmonella* e *Bacillus cereus* a homogeneização da amostra foi feita em 225 mL de Caldo Lactosado (CL) e 450 mL de água peptonada 0,1% respectivamente.

Antes das análises, foi feita desinfecção da bancada com álcool 70% e todas as vidrarias estavam estéreis.

### 5.2 Isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva

Para contagem de *Staphylococcus* spp. foi utilizado o método Número mais provável (NMP) recomendado para alimentos naturais e não processados, com pouco crescimento de *Staphylococcus* spp. e altas contagens de microrganismos competidores.

Inoculou-se porções de 1ml de cada diluição, em uma série de três tubos contendo 10ml de Caldo Tryptic Soy Broth (TSB), acrescentado 10% de Cloreto de Sódio (NaCl). Incubou-se os tubos a 36°C/48h e observou-se o crescimento bacteriano.

Para confirmação, semeou-se uma alçada da cultura de cada tubo positivo, tubos turvos indicando crescimento bacteriano, em placas de Ágar Baird-Parker (BP) e incubou-se a 36°C/48h. Verificou-se a presença, de colônias típicas destes microrganismos: circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca ou halo transparente se estendendo para além da zona opaca (Fig. 1). No caso de ausência dessas características típicas, não se considera a colônia como *Staphylococcus* e sim de algum outro microrganismo.

Após a confirmação das colônias típicas, selecionou-se uma ou mais colônias de cada placa, semeou-se em tubos de Ágar Nutriente (AN) e incubou-se a 36°C/24h, para realização de coloração de Gram e posteriormente a realização da prova de coagulase.

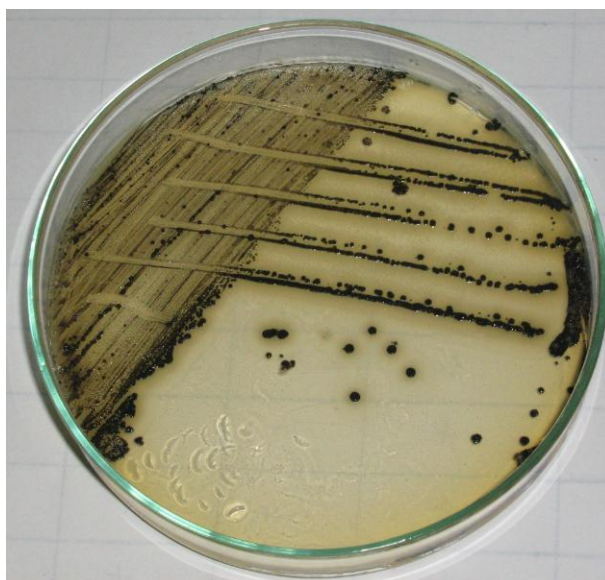


Figura 1- Placa de Ágar Baird Parcker apresentando colônias negras com halo transparente, características de *Staphylococcus* spp.

O teste de coagulase (Fig.2) foi feito através da transferência do inóculo, pelo método de dispersão, para um tubo contendo 2 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubou-se a 36°C/24h. Retirou-se 1,8 mL do inóculo e adicionou-se 0,2 mL de coagu-plasma<sup>®</sup>, misturando com movimentos de rotação, sem agitar para não interferir na coagulação. Incubou-se novamente a 35°C e a cada hora verificou-se se houve formação de coágulo, em um período de 6 horas.



Figura 2 - Teste de coagulase livre positivo para confirmação de *Staphylococcus* spp.

Anotou-se o número de tubos de TSB-NaCl confirmados pela coagulase e determinou-se o NMP/g de produto, analisado através da tabela de Hoshinks.

### 5.3 Isolamento e identificação de Coliformes termotolerantes

De cada diluição citada no item 5.1, retirou-se um mL e colocou-se em tubos contendo 9 mL de caldo lactosado estéril, incubou-se a 36°C/24-48 horas, com a finalidade de fazer um teste presuntivo de Coliformes totais.

Com a verificação dos tubos positivos de caldo lactosado, tubos turvos com formação de gás nos tubos invertidos de Durhran, passa-se uma alçada de cada tubo positivo para os tubos de Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB), para confirmação da presença de Coliformes totais, e incubou-se a 36°C/24-48 horas. Após o período de incubação, verificaram-se os tubos de CLBVB positivos, com turvação e formação de gás no tubo de Durhran, passou-se então uma alçada de cada tubo positivo para tubos de EC (*E. coli*) para confirmação de coliformes termotolerantes e incubou-se a 45°C/24-48 horas, em banho maria.

Após o período de incubação contou-se os tubos positivos, com turvação e formação de bolha de ar no tubo de Durhran, e verificaram-se os resultados na tabela do Número Mais Provável (NMP).

Para a identificação de *Escherichia coli*, pegou-se uma alçada de cada tubo de EC (*E. coli*) positivo e passou-se, pela técnica de esgotamento, para placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), incubou-se a 36°C/24-48 horas. Após o período de incubação, selecionaram-se as colônias características, mucóides com brilho

metálico (Fig. 3), e passou-se para Ágar Nutriente para conservação e então foram feitos os testes bioquímicos: Methyl Red e Voges-Proskauer (MRVP), Ágar Citrato de Simmons e Motilidade, Indol e produção de Acido Sulfídrico (SIM), de acordo com Konneman et al.,2001.



Figura 3- Placa de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), apresentando colônias mucóides com brilho metálico, características de *Escherichia coli*.

#### **5.4 Isolamento e identificação de *Salmonella*:**

Para isolamento e identificação de *Salmonella* sp, foram pesadas assepticamente 25g de amostra, homogeneizada em 225mL de Caldo Lactosado (CL), e incubado a 36°C por 24 horas para recuperação de células injuriadas. Após, a amostra foi inoculada em tubos contendo os meios de enriquecimento seletivo Rapaport (RR), Tetracionato (TT) e novamente incubados a 36°C por 24 horas. Após este período, aliquotas de cada tubo inoculado, foram semeados em placas, através do método de esgotamento, contendo os meios seletivos Ágar Hektoen-Enteric (HE) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), e incubadas a 36°C por 24 horas. Colônias suspeitas (Fig.4) de *Salmonella* foram submetidas a testes bioquímicos nos meios Ágar Lisina Ferro (LIA), Ágar Tríplice de Ferro (TSI) e Caldo de Uréia para obtenção de resultados conclusivos, de acordo com Konneman et al.,2001. Havendo resultados positivos para estes testes, as colônias foram submetidas à identificação sorológica usando os soros anti-salmonela polivalente somático.

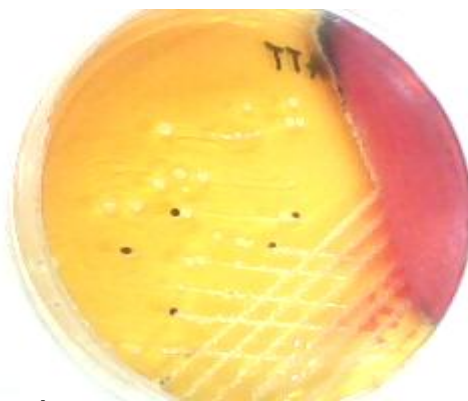


Figura 4- Placa de Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), com colônias negras, características de *Salmonella* spp.

### 5.5 Isolamento e identificação de *Bacillus cereus*:

Para isolamento e identificação de *Bacillus cereus*, foram pesadas assepticamente 50g de amostra e homogeneizada em 450 mL de água peptonada 0,1%. Inoculou-se porções de 1ml de cada diluição, em uma série de três tubos contendo 10ml de Caldo Tryptic Soy Broth (TSB), acrescentado polimixina (0,2%). Incubou-se os tubos a 30°C/48h e observou-se o crescimento.

Para confirmação, semeou-se uma alçada da cultura de cada tubo positivo, tubos com turvação indicando crescimento bacteriano, em placas de Ágar manitol gema de ovo polimixina (0,2%) (MYP).

As placas foram incubadas a 30°C por 48h, e foram selecionadas placas com colônias típicas, ou seja, esféricas com a coloração rósea leitosa, com bordas perfeitas, planas, secas, rodeadas por um grande halo de precipitação devido à reação da lecitinase sobre a gema de ovo (Fig. 5). As colônias suspeitas de serem *B. cereus* foram repicadas em Ágar Nutriente e incubadas a 30°C por 48h para posteriores provas bioquímicas: Teste de Salicina, Teste de utilização da Glicose, Teste de redução do nitrato, Teste de hidrólise de gelatina, Teste do Manitol, Teste de Lecitinase e Teste da atividade hemolítica, de acordo com Konneman et al.,2001..



Figura 5- Placa de Ágar manitol gema de ovo polimixina (MYP), apresentando colônias opacas, secas e com presença de halo características de *Bacillus cereus*.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas três tipos de doces confeitados: Trouxinha de Chocolate (I), Beijo de Alemão (II) e Panelinha de coco com ovos (III) de quatro estabelecimentos (A, B, C e D), sendo duas feiras livres (C e D) e dois fechados (A e B), com cinco repetições de cada estabelecimento, totalizando 60 amostras.

Os resultados de contaminação total dos doces foram relevantes, pois ocorreu algum tipo de contaminação bacteriana em 25 (38%) do total de amostras analisadas.

Os índices de contaminação nos doces do tipo I (Fig. 6) e tipo II (Fig. 7) podem estar relacionados com o modo de preparo, pois ambos são manipulados, bem como com seus ingredientes (leite, açúcar e chocolate) visto que estes proporcionam melhores condições para o desenvolvimento de microrganismos (LUCCA e TORRES, 2002).

O doce tipo II inclui produtos amiláceos em sua composição, como castanhas, o que favorece a contaminação por *Bacillus cereus* (JAY, 1992), Doces do tipo III (Fig. 8), não apresentam produtos amiláceos, mas contém em sua formulação ovos, o que contribui para a presença de *Salmonella* spp, visto que esta bactéria é normalmente encontrada em alimentos contendo este ingrediente.

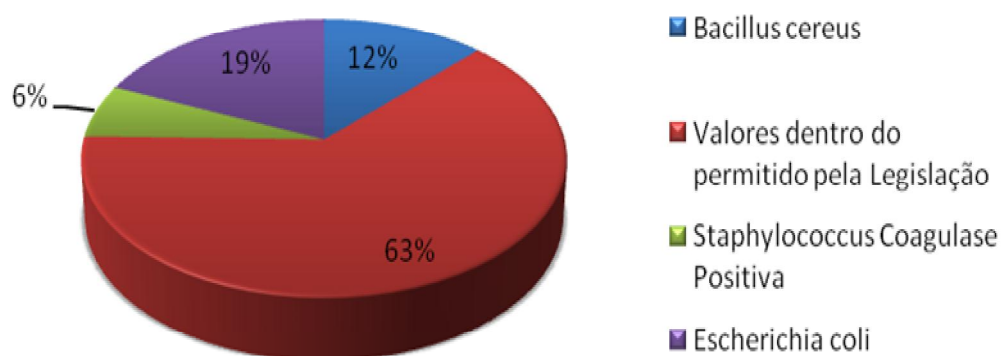


Figura 6 - Índice de contaminação encontrado no doce do tipo I (Touxinha de Chocolate), comercializado na cidade de Pelotas-RS.

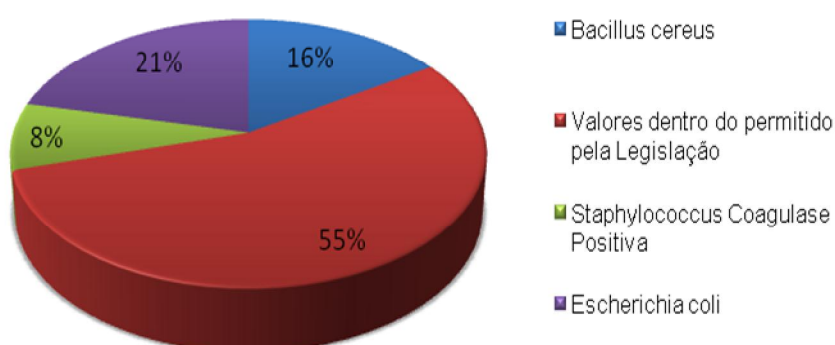


Figura 7 - Índice de contaminação encontrado no doce do tipo II (Beijo de Alemão), comercializado na cidade de Pelotas-RS.

O Doce tipo II apresentou um maior índice de contaminação bacteriana, o que pode ser devido ao fato da variedade de nutrientes em sua formulação como chocolate, leite, mousse e envolto de castanhas, ou por sofrer manipulação.

O único doce que estava contaminado por *Salmonella* spp. foi o Doce tipo III, importante ressaltar, que sua formulação era a base de ovos, fator este que contribui para a presença desta bactéria.



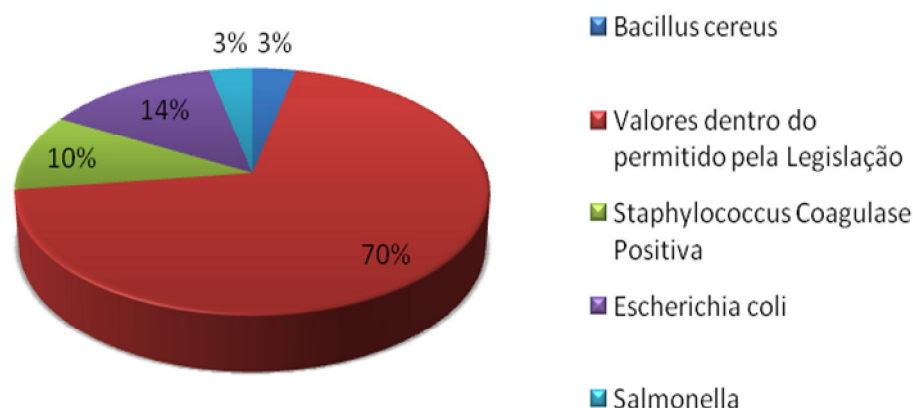


Figura 8 - Índice de contaminação encontrado no doce do tipo III (Panelinha de Coco com Ovos), comercializado na cidade de Pelotas-RS.

Os estabelecimentos que comercializaram os doces com maior índice de contaminação foram C e D (Fig. 9), indicando que os doces comercializados nas feiras têm uma maior contaminação que aqueles que são vendidos em estabelecimentos fechados. Esses dados corroboram a hipótese de que alimentos comercializados em vias públicas são potenciais fontes de intoxicações alimentares (CUELLAR, 1992; MOSUPYE; HOLY, 1999), uma vez que se encontram em condições de armazenamento fora dos padrões ideais e muitas vezes localizados em vias públicas, onde é frequente a circulação de carros e pessoas.

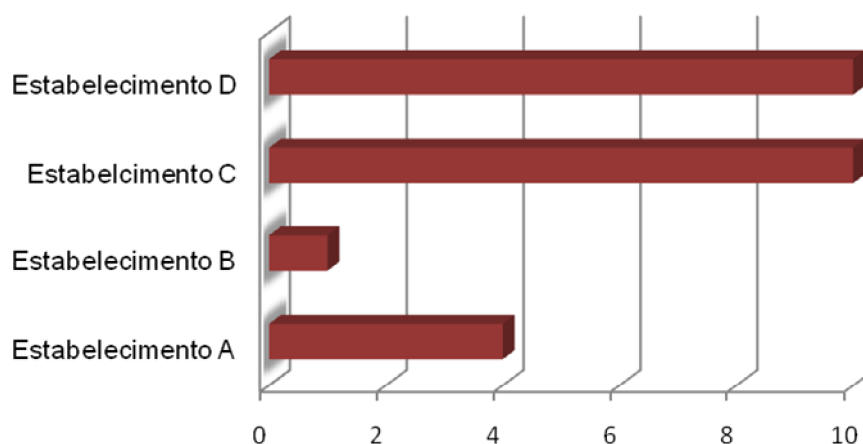


Figura 9 - Contaminação bacteriana nos doces comercializados em quatro diferentes estabelecimentos da Cidade de Pelotas-RS.

A matéria prima, condições de armazenamento e comercialização do alimento, são fatores determinantes para a contaminação do mesmo.

A análise de *Bacillus cereus* indicou que este microrganismo encontra-se em nível acima do permitido pela ANVISA que é de  $10^3$  NMP/g de alimento em 18% das amostras analisadas (Fig. 10), e com maior ocorrência no doce do tipo II (16%). Este resultado já era esperado, pois uma das matérias primas deste doce, as castanhas, favorecem o crescimento desta bactéria. Outras possíveis fontes de contaminação dos doces podem ser os manipuladores, bem como o ambiente, visto que a bactéria em questão é esporulada e se encontra suspensa no ambiente por maiores períodos de tempo.

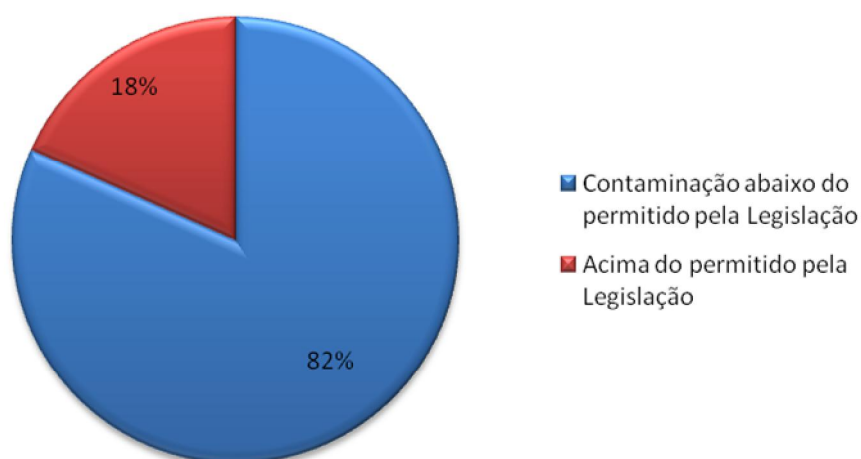


Figura 10 - Presença de *Bacillus cereus*, em amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas-RS.

Gomes et al. (2004) constataram um índice de contaminação por esta bactéria semelhante ao verificado, pois em sua pesquisa das 200 amostras de doces industrializados comercializados por ambulantes nos municípios de Seropédica e Itaguaí . RJ, 40 amostras (20%) foram positivas para o isolamento de *B. cereus*, atestando que os alimentos em questão podem causar danos à saúde do consumidor, sobretudo toxinfecções alimentares. O mesmo índice de contaminação foi descrito por Carneiro, Gonçalves e Hoffmann. (2005), onde analisaram 10 amostras de Bombas de Chocolate com recheio de creme provenientes de padarias de São José do Rio Preto/SP. Em se tratando desse microrganismo em particular, os

relatos de doenças de origem alimentar que lhe são atribuídos são escassos, com muitas ocorrências não suspeitas ou não confirmadas (RADHIKA et al. 2002).

Souza (1998), Granada et al. (2003) analisaram 30 quindins obtidos em doçarias de Pelotas-RS e Peixoto et al. (2009) analisando doce de leite e de amendoim, não encontraram o microrganismo em questão em nenhum dos estudos.

No entanto, Ferrari, Winkler e Oliveira (2007) evidenciaram a presença desta bactéria, porém em níveis permitidos pela legislação. Porém, como a bactéria é potencialmente patogênica, apresentam risco de toxinfecções aos consumidores imunodeprimidos.

A pesquisa de coliformes em alimentos é utilizada como indicador das condições higiênico-sanitárias e a presença de coliformes termotolerantes comprovam que houve algum tipo de falha no seu processamento. Esta contaminação pode ter ocorrido na fabricação do alimento ou na sua comercialização. Este grupo de microrganismos é de grande importância pois indicam contaminação fecal recente e evidenciam a possível presença de microrganismos patogênicos.

O presente estudo pode comprovar o descuido no processo de fabricação ou comercialização dos doces (Fig. 11), pois 30% do total das amostras estavam com uma contaminação de Coliformes Termotolerantes superior a  $10^2$  NMP/g de alimento, sendo assim, fora dos padrões exigidos pela legislação.

Mortatti et al. (1992) avaliaram 39 amostras de doces cremosos na cidade de Araraquara . SP, sendo que 7,7% estavam com índice maior que o permitido, para Coliformes Termotolerantes, resultado esse inferior ao obtido no presente trabalho.

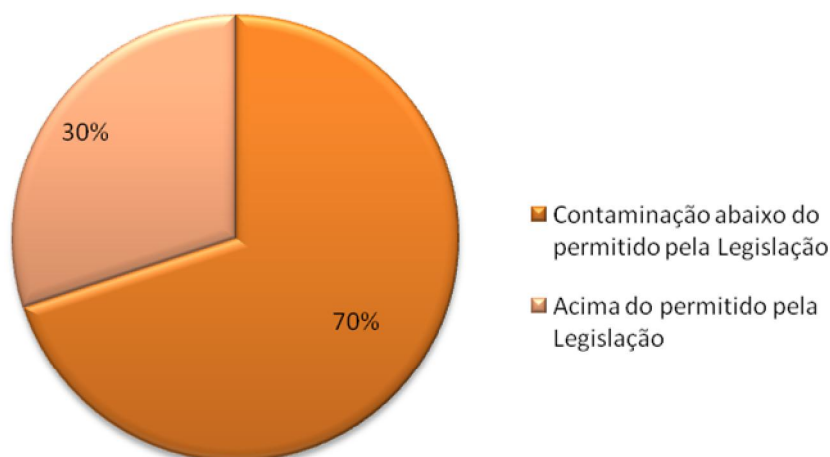


Figura 11 - Presença de Coliformes Termotolerantes, nas amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas-RS.

Souza (1998), em sua pesquisa com produtos de confeitaria, apresentou uma porcentagem igual ao presente trabalho, onde 30% das amostras encontraram-se contaminados por Coliformes termotolerantes acima dos valores permitidos pela legislação. Casalini et al. (2008) evidenciaram que 33,3% das amostras de seu estudo, ultrapassaram os limites permitidos na legislação para coliformes termotolerantes. A incidência deste grupo de bactérias nos produtos lácteos comercializados na cidade de Fortaleza-CE foi verificada por Brito (1995), condenando 43,1% das amostras examinadas, concluindo que poderia comprometer a saúde dos consumidores.

Peixoto et al. (2009), nas 29 amostras analisadas de tortas, bolos, doces e similares a base de creme, comercializados em diferentes pontos de venda da cidade de Ribeirão Preto-SP, apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes acima do valor estabelecido em 27,6% do total das amostras.

Granada et al. (2004), não confirmaram a presença desta bactéria nas 30 amostras de quindins coletados em Pelotas-RS. Este resultado difere do presente estudo, devido ao modo de produção dos doces analisados, já que estes são manipulados após seu processamento térmico.

O principal representante do grupo dos Coliformes termotolerantes é a espécie *Escherichia coli*. Sua presença nos alimentos indica uma contaminação fecal-oral recente, e suas linhagens podem causar infecção alimentar podendo levar a morte os indivíduos imunossuprimidos.

Neste trabalho foi identificada a presença de *E. coli* em 22% do total das amostras analisadas, (Fig. 12). Ferrari et al. (2007) verificaram essa bactéria em 18,3% das amostras de doces comercializados na região de Londrina- PR, índice este menor do encontrado neste estudo.

Peixoto et al. (2009) identificou esta bactéria em 27,6%, nos produtos de confeitaria comercializados na cidade de Ribeirão Preto-SP, valores bem próximos ao encontrados em nosso trabalho. Estes resultados indicam o possível descuido higiênico-sanitário do manipulador, ou contaminação da matéria prima, pois sua ocorrência nos diz que houve uma contaminação fecal recente.

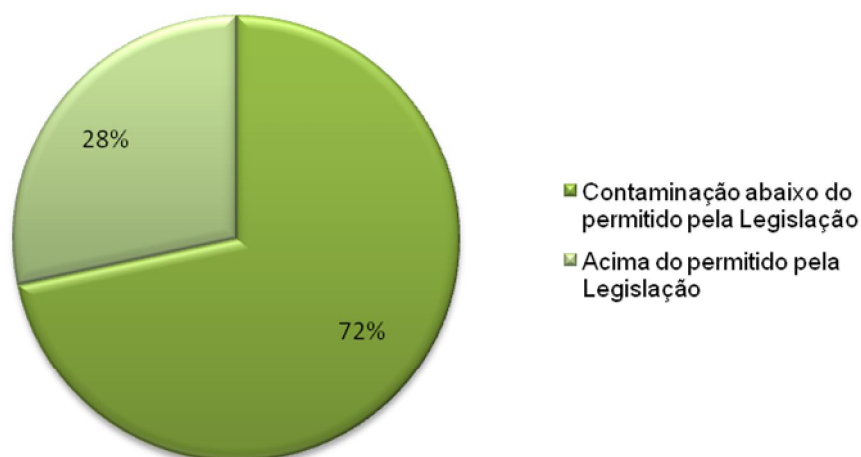


Figura 12 - Presença de *Escherichia coli*, em amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas-RS.

Casalini et al. (2008) analisaram 9 doces comercializados no Campus da UFPel, e confirmaram a presença de *E. coli* em uma amostra de seu estudo.

Nos estudos de Granada et al. (2003), onde analisaram-se 30 amostras de quindins comercializados em Pelotas-RS, não foi verificada a presença desse microrganismo. Na mesma cidade, Blume (2007), em sua pesquisa com rapaduras, assim como Destri et al. (2009), onde avaliaram-se amostras de doces de leite comercializados em feira e Sá et al. (2009) onde avaliaram-se doces em massa, também obtiveram os mesmos resultados para a presença desta bactéria.

Resultados que diferem dos obtidos no presente trabalho, uma vez que os alimentos em questão eram produzidos de forma diferente, e não sofriam manipulação após o cozimento.

A pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em doces de confeitaria é uma preocupação há muitos anos no Brasil. Já que este patógeno tem como habitat natural as fossas nasais, pele, cabelo e unhas dos seres humanos, fazem com que o manipulador torne-se uma potencial fonte de contaminação. Ferrari, Winkler, e Oliveira. (2007), comprovaram a presença deste patógeno em 21,6% dos alimentos estudados.

Estes índices foram mais altos que o do presente estudo, onde 13% (Fig. 13) do total das amostras analisadas estavam com contaminação acima de  $10^3$  NMP/g de alimento, estando fora do permitido pela ANVISA, levando risco de intoxicação alimentar ao consumidor.

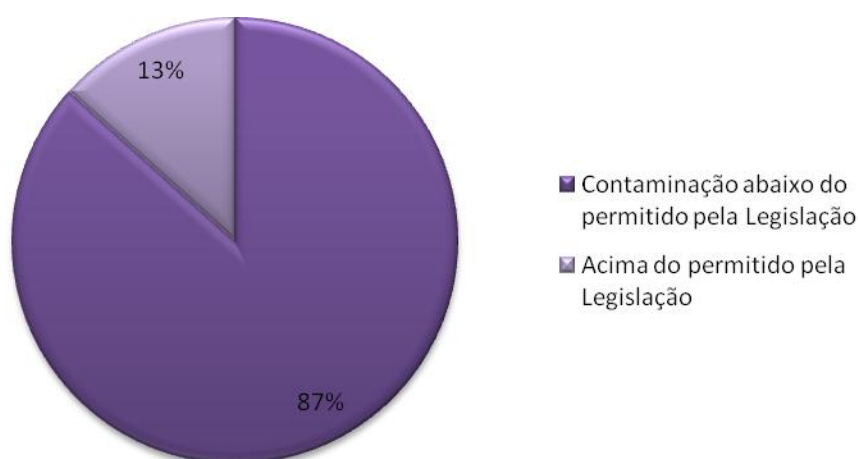


Figura 13 - Presença de *Staphylococcus* Coagulase Positiva, em amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas-RS.

Mortatti et al. (1992), realizaram avaliação microbiológica de 39 amostras de doces cremosos comercializados na cidade de Araraquara/SP, onde foi detectada contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva acima do permitido em 2,5% das amostras, resultados que diferem do encontrado no presente estudo.

Esta diferença deve-se ao fato do alimento estudado por Mortatti et al. não sofrer manipulação após o processamento, diferentemente dos doces analisados no nosso estudo, onde a manipulação era existente.

Os resultados verificados no presente estudo diferem de Granada et al. (2003), Blume (2007), Casalini et al. (2008), Peixoto et al. (2009) e Destri et al. (2009) onde *Staphylococcus* spp. não estiveram presentes em nenhuma de suas

amostras, descartando a possibilidade de causar uma intoxicação alimentar ocasionada pela toxina estafilocócica, aos consumidores.

Souza et al. (2005) verificaram que 4 (17%) das 24 amostras de doces analisadas estavam com uma concentração de *Staphylococcus* coagulase positiva, acima do permitido, semelhante ao encontrado no presente trabalho.

Com relação às análises feitas para a confirmação de *Salmonella* spp. o presente trabalho obteve como resultado a presença do microrganismo em uma amostra (2%) dentre todas as analisadas (Fig. 14).

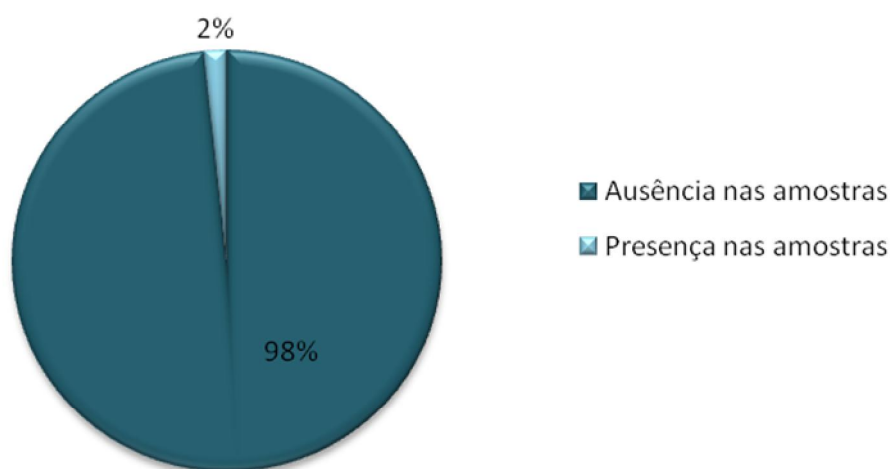


Figura 14 - Índice de *Salmonella* spp. em amostras de doces comercializados na cidade de Pelotas/RS.

Os resultados obtidos por Souza (1998), que verificou a qualidade microbiológica de produtos de confeitaria em Belo Horizonte, Minas Gerais, no ano de 1998, foram os mesmo encontrados em nosso trabalho, onde a presença de *Salmonella* spp. foi comprovada em apenas uma das amostras. Mesmo que encontrada em um numero pequeno de amostras, demonstra um risco a saúde do consumidor, já que esta bactéria tem um alto grau de patogenicidade podendo causar infecções alimentares e até septicemia.

Mortatti et al. (1992), Philippi; Moretto (1995), Granada et al. (2003) Araujo et al. (2008), Sá et al. (2009) e Destri et al. (2009) em suas análises, constataram ausência total deste microrganismo, resultados importantes visto a alta incidência de surtos de salmonelose, aliado à gravidade da doença, segundo constatado por Luca; Koerich (2008).

Os resultados de Welker et al. (2010), demonstram a necessidade de maior atenção na área de segurança dos alimentos, pois das 28 amostras de doces, 12% estavam contaminados por *Salmonella* spp., evidenciando a necessidade de orientar e educar a população quanto aos cuidados necessários na conservação, manipulação e consumo dos alimentos, às boas práticas de fabricação e aos riscos que os alimentos contaminados representam.



## 7 CONCLUSÕES:

Os resultados demonstraram que das 60 amostras analisadas, 18 (30%) estavam contaminadas por Coliformes termotolerantes com presença de *E. coli* em 17 (94%) destas,

*Bacillus cereus* esteve presente com níveis acima do permitido pela ANVISA em 11 (18%) amostras;

Foi constatada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do limite permitido pela ANVISA em 8 (13%) amostras;

A presença de *Salmonella* spp foi constatada em uma (2%) amostra;

Concluiu-se então, que é indispensável uma vigilância sanitária mais severa para diminuir a contaminação dos doces, assim como programas de educação aos manipuladores de alimentos, tornando-os seguros ao consumidor.

## 8 REFERÊNCIAS

- ARAMBULO, P.; ALMEIDA, C. R.; CUELLAR, J.; BELLOTO, A. J. Street food vending in Latin America. **Bull. Pan. Am. Health Organ**, v. 28, n.4, p.344-354, 1994.
- ARAÚJO, W. M. C. Perfil higiênico-sanitário das panificadoras do Distrito Federal. **Higiene Alimentar**. São Paulo: v.15, n.83, p.32-42, maio, 2003.
- ASSUMPÇÃO, E. G.; PICCOLI-VALLE R.H.; HIRSCH, D.; ABREU, L.R.; Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 55, n. 3, Belo Horizonte. 2003.
- BLUME S.I.; **Alimentos manipulados: Riscos constantes na transmissão de toxinfecções alimentares**. 2007, 54f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas- Instituto de Biologia) - Universidade Federal de Pelotas.
- BLUME, S. I.; CASTELLI, R. M.; RIBEIRO, G. A. PRESENÇA DE *Staphylococcus coagulase positiva* em rapaduras comercializadas na cidade de Pelotas/RS. **XVI Congresso de Iniciação Científica e IX Encontro de Pós-Graduação**, Nov. 2008
- BRAGANÇA, M. G. L. Boas Práticas de fabricação para o processamento artesanal de alimentos. Belo Horizonte: EMATER-MG, 2001. 20p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC. Nº12 de 2 de janeiro de 2001. **Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 jan. 2001. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word>>. Acesso em: 12 junho 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos". **Diário Oficial da União**, Brasília, 01 ago. 1997. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=100&word>>. Acesso em: 18 julho 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SVS/MS nº326, de 30 de Julho de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. **Agência de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 18 junho 2009.
- BRITO, E.C. et al. Avaliação da incidência de coliformes totais e fecais nos produtos lácteos . leite, queijo, sorvete e doce de leite . comercializados em Fortaleza - CE. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, I, Campinas. **Anais...** Campinas: Associação Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1995.
- BRUM, A. A. **Ocorrência de *Bacillus cereus* em diferentes alimentos a base de amido no comércio da cidade de Pelotas-RS**, 2001. 23f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas- Instituto de Biologia) - Universidade Federal de Pelotas.

- CANEVER, M. D.; KOHLS, V. K. ; COLLE, G; ALMEIDA, L. F.. Sistema local de produção de doces artesanais de Pelotas: possibilidades de alavancagem. **Revista brasileira Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 05-11, jan-mar, 2004.
- CARDOSO, R.C.V. **Avaliação do grau de higiene de manipuladores de alimentos em restaurantes de pólo petroquímico de Camaçari, Salvador**. 1999. 138f. Monografia (Especialização em controle de qualidade de alimentos) - Universidade Federal da Bahia.
- CARNEIRO, A. A. J.; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMANN, F. L. Estudo higiênico-sanitário de bombas de chocolate com recheio de creme. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 78-86, 2005.
- CARVALHO, E. P. Toxinfecções alimentares: textos acadêmicos. Lavras: Universidade Federal de Lavras/FAEPE, 2005. 75p.
- CASALINI, J.; STEURER, F.; RODRIGUES, A. O.;PACHECO, D. O.; PEREIRA, G. W.; PAZ, M. F.; NOGUEIRA, M. B.; FERREIRA, P. B.; HALLAL, S. L. M.; BORGES, C. D.; MACHADO, M. R. G. Qualidade higienico-sanitária de doces de confeitaria comercializados no campus da UFPel . **RS. XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação**, Nov. 2008.
- CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS B. S. O.; *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil), **Ciência Tecnologia Alimentar**, v. 21, n. 3, 2001.
- CUELLAR, J. Alimentos de venta callejera y la transmisión del colera en América del Sul. **Documento prestado a La Consulta Conjunta de Expertos FAO/OPS/OMS sobre incuidad y comercializacion de alimentos frente a la epidemia de cólera**. Buenos Aires, AR, 6 a 8 de abril, 1992.
- CURTIS, M.L. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.50, n.2, p.177-182, 2000.
- DESTRI,K.; BAIROS, J.; VARGAS, B. L.; NASCENTE,P. S.; PINO, F. A. B. D.; LUND R. G.; Análise microbiológica de doces de leite vendidos em feiras livres de Pelotas, Estado do Rio Grande do Sul, **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 2, p. 153-157, 2009.
- DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A. M.; SILVA, J.V.D.; MOTA, R.A. Pesquisa de *listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores Higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e Comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.
- FERRARI, R. G.; WINKLER, S. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M., Avaliação microbiológica de alimentos isentos de registro no Ministério da Saúde, **Ciencias Agrarias**, v. 28, n 2, p. 241-250, abr-jun-2007.
- FETTER, LEILA. **Leila quer selo de qualidade e certificação de origem para os doces de Pelotas**. Porto Alegre, Junho de 2003. Disponível em: [http://www.al.rs.gov.br/dep/site/fotos\\_site/geral/leila/publicacoes/02.pdf](http://www.al.rs.gov.br/dep/site/fotos_site/geral/leila/publicacoes/02.pdf). Acessado em 30 Julho de 2009.
- FIGUEIREDO, R. M. **Guia prático para evitar DVAs- Doenças Veiculadas por Alimentos**. Coleção Higiene dos Alimentos, v. 2, São Paulo: Editora Manole, 2002.

98p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Editora Artmed: Porto Alegre, RS, 2002. 424p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, São Paulo: Ed. Atheneu, 2006. 182p.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, P. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4 ed., Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1993. 229p.

GERMANO, M. I. S. **Treinamento de Manipuladores de Alimentos: fator de segurança alimentar e promoção da saúde**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 165p.

GERMANO, P. M. L.; GERNANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 665p.

GÓES, J. A. W.; FURTUNATO, D. M. N.; VELOSO, I. S.; SANTOS, J. M. Estabelece padrões microbiológicos para alimentos e a qualidade de alimentação servida. **Higiene Alimentar**, v.15, n. 82, p. 20-22, 2001.

GOMES, L. P.; RODRIGUES, M. M.; SOARES, G.; BARONI, F. A.; SOUZA, M.M. S.; *Bacillus cereus* em amostras de doces industrializados comercializados por ambulantes nos municípios de Seropédica e Itaguaí . RJ. **Rev. Univ. Rural**, v. 24, n.2, Jul.-Dez, p.181-184, 2004.

GRANADA, G.G.; MENDONÇA, C.R.B.; PORTO, C.; ROSA, F.; SILVA, E.; SILVA, W.P.; KOETZ, P.R.; ZAMBIAZI, R.C. Hygienic sanitary profile of quindins commercialized in Pelotas/RS. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 14, n.1, p. 57-61, 2003.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 1999. 376p.

JAY, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. Artmed. São Paulo. 2005.6ª ed.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**, 3ª ed., Ed. Acribia S.A. Zaragoza, p. 279-513, 1992.

KONNEMAN, W.E.; ALLEN, D. S.; JANDA, M. W.; SHRECKENBERGER, C. P.; WINN Jr., C. W. **Diagnóstico Microbiológicos** . Texto e Atlas Colorido, 5 ed., Ed. Medsi, 2001. 668p.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. *Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente*. **Ciência. Rural**, v. 31, n. 6, 2001.

LUCA, A. N. B., KOERICH, G. M. D.; **Perfil epidemiológico dos surtos de dta causados por *Salmonella* sp em Santa Catarina, Brasil, notificados no SINAN NET de 2006 a 2008**, 20f. Monografia (Curso de (Especialização em Microbiologia como requisita para obtenção do Título de Especialista em Microbiologia) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

LUCCA, A.; TORRES, E. A. F. S. Condições de higiene de %cachorro quente+ comercializado em vias Públicas. **Rev. Saúde Pública**, v.36, n.3, p. 350-352, 2002.

MAGALHÃES, M. O. **Doces de Pelotas: tradição e história**. Pelotas. Ed. Armazém Literário, 2001. 61 p.

MORTATTI, M.P.L., ZAVARIZI A. C. M.; OUTUKA, M. S.; SILVA, K. C.; MATIAZI, H. J.; LEITE.K. M. C. Avaliação microbiológica de doces cremosos comercializados na cidade de Araraquara-SP. **Alim. Nutr.**, São Paulo, v.4, p.89-97, 1992.

MOSUPYE, F.M.; HOLY, A.V.. Microbiological quality and safety of ready-to-eat street- vended foods in Johannesburg, South Africa. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 11, p. 1278 . 1284, 1999.

NASCIMENTO, G. G. F.; ROMERO, C. E. M.; CAMPOS, M. S. P.; SOUZA, R. L.; CALÇADA, M. L. M. Avaliação microbiológica de alimentos comercializados em lanchonetes *de campi* universitários. **Higiene Alimentar** v.17, n.110, p.85-89, Jul. 2003.

NAVARRO, S.H.V.R. Treinamento para manipuladores de alimentos: enfoque nas técnicas de treinamento exemplificado com a lavagem das mãos. [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2000.

NOLLA, A.C.; CANTOS, G.A.. Relationship between intestinal parasites in food handlers and epidemiological factors in the city of Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 2, 2005.

OLIVEIRA D. D.; SILVA E.N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.v.52, n.6, Belo Horizonte. 2003.

OLIVEIRA, Y. S.; INHAN, T.M. Surto de salmonelose por bolo confeitado, Brasília, DF, 1996. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5. 1998, Águas de Lindóia. **Resumos ... Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Microbiologia**, 1998. p. 67.

OLIVEIRA,A. M.; GONÇALVES, M. O.; SHINOHARA, N. K. S.; STAMFORD, T.L. M. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. **Higiene Alimentar**, v.17, n.114/115, p. 12-19, 2003.

PANETTA, J.C. O manipulador: Fator de segurança e qualidade dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.12, n. 57, p 8-10, 1998.

PEIXOTO D.; WECKWERH P. H.; RAVASI E. M.; SIMIONATO, S.; Avaliação da qualidade microbiológica de produtos de confeitaria comercializados na cidade de Ribeirão Preto / SP, **Alim. Nutr.**, v.20, n.4, p. 611-615, out./dez. 2009.

PHILIPPI, J. M. S.; MORETTO, E.; Ocorrência de *Salmonella* e Coliformes de Origem Fecal na Canela em Pó (*Ciannmomum cássia* Blume a *Ciannmomum zeylanicum* Nees) comercializada em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 11 (4): 624-628, out/dez, 1995.

PIRAGINE, K. O. **Aspectos higiênicos e sanitários do preparo de merenda escolar na rede estadual de ensino de Curitiba**. 2005. 122f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n. 1 455p, 1988.

RADHIKA B, PADMAPRIYA BP, CHANDRASHEKAR A, KESHAVA N, VARADARAJ MC. Detection of *Bacillus cereus* in foods by colony hybridization using PCR-generated probe and characterization of isolates for toxins by PCR. **Int J Food Microbiol** 2002; 74:131-8.

RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**, 3ed., São Paulo: Ed. Atheneu, 2005, 455p.

RIO GRANDE DO SUL (Estado). Secretaria do Desenvolvimento e dos Assuntos Internacionais. **Diagnóstico preliminar para o setor de doces artesanais**. Porto Alegre, 2000, 20 p.

RODRIGUES, K. L.; GOMES, J. P.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; BROD, C. S.; Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. **Higiene Alimentar**, v.15, n.82, p. 20-22, 2003.

ROLL, R. J. **Qualidade microbiológica de doces confeitados produzidos em Pelotas-RS**. 2002.36f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas- Instituto de Biologia) - Universidade Federal de Pelotas.

SÁ C. P.; MAGALHÃES, C. H.; WELLINGTA C.; BENEVENUTO, CARLOS, A. N.; F. G; SILVA E. C.; Avaliação de parâmetros de qualidade de doce em massa e das matérias primas utilizadas na formulação, II Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG campus Bambuí, II **Jornada Científica**, 19 - 23 Out. 2009.

SILVA JR., E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo, 1995, 264p.

SILVA, C.A.; SOUZA, E.L.; SOUZA, C.P. Estudo da qualidade sanitária de carne moída comercializada na cidade de João Pessoa, PB. **Revista Higiene Alimentar**, vol. 18, nº126, p.90-95, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2007, 295p.

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilocococs coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene alimentar**, São Paulo, v.18, n.122, p. 32-40, 2004.

SIQUEIRA, L. M.; DELÚ, M. A. F; SBAMPATO, C. G.; MENDONÇA, A. T.; Ocorrência de gastroenterites relacionado as à ingestão e manipulação inadequada de alimentos. **Higiene Alimentar**, v.20, n.144, p.34-36, 2006.

SOTO, F. R. M.; RISSETO, M. R.; LÚCIO, D.; SHIMOZAKO, H. J.; CAMARGO, C. C.; IWATA, M .K.; CAMARGO, C. A.; OLIVEIRA, E.; CAMARGO, S. R. Metodologia de avaliação das condições sanitárias de vendedores ambulantes de alimentos no município de Ibiúna, SP. *Revista brasileira de epidemiologia*. 2008; 11(2)297-303.

SOUZA, D. L.T; SILVÉRIO, F. L.; OLIVEIRA, T. S.; BIANCHI, M. C.; GOLLUCKE, A. P. B.; BIANCHI, M. C. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em doces recheados vendidos em feiras-livres. **Higiene Alimentar**, v.19, n.132, p. 49-57, jun. 2005.

SOUZA, S. O. Levantamento de surtos de toxinfecções alimentares em bolos confeitados, tortas e pavês consumidos em Belo Horizonte, Minas Gerais, no ano de 1998, In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 3., 1999, Campinas-SP. **Resumos ...** Campinas: UNICAMP, 1999. p. 102.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 8ed., São Paulo: Ed. Artmed, 2005, 894p.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C; Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de

doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, jan./mar. 2010.

## **ANEXOS**



## 1. Meios de cultura utilizados para as análises microbiológicas:

### ÁGUA PEPTONADA (0,1%)

Peptona	1,0g
Água destilada	1000mL
pH 7,0	

### CALDO LACTOSE BILE VERDE BRILHANTE

Bile de boi (oxgall)	20,0g
Peptona	10,0g
Lactose	10,0g
Verde Brilhante(13,3mL de solução aquosa 0,1%)	0,0133g

Diluir em 1000mL de água destilada  
pH 7,2

### CALDO LACTOSADO

Extrato de carne	3g
Peptona Bacteriológica	5g
Lactose	5g

Diluir em 100mL de água destilada  
pH 6,9

### CALDO EC

Triptose	20g
Lactose	5g
Sais Biliares nº3	1,5g
Fosfato monoácido de potássio	4g
Fosfato biácido de potássio	1,5g
Cloreto de Sódio	5g

Diluir em 1000mL de água destilada  
pH 6,9

## CALDO TETRATIONATO

Proteose peptona	5,0g
Sais biliares	1,0g
Tiosulfato de sódio	30,0g
Carbonato de cálcio	10,0g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 8,4	

suplemento	
Solução de iodo	0,2mL/10mL base
Solução 0,1% verde brilhante (opcional)	0,1mL/10mL base

## CALDO RAPPAPORT

Peptona de farinha de soja	4,5g
Cloreto de magnésio hexahidrato	29,0g
Cloreto de sódio	8,0g
Fosfato dopotássico	0,4g
Dihidrogeno fosfato potássico	0,6g
Verde malaquita	0,036g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 5,2	

## CALDO URÉIA

Peptona	1,0g
Dextrose	1,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato monopotássico	2,0g
Uréia	20,0g
Vermelho de fenol (6mL de solução 0,2%)	0,012g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 6,8	

## CALDO TRIPTONA de SOJA

Caseína enzimática hidrolisada	17.00g
Digestão Papaica de Soja	3.00g
Dextrose	2.50g
Cloreto de Sódio	5.00g
Fosfato Dipotássico	2.50g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 7,1	

## CALDO VERMELHO DE FENOL

Digestão Péptica do tecido animal	10g
Cloreto de Sódio	5g
Lactose	10g
Vermelho fenol	0.018g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 7,0	

## ÁGAR EOSINA AZUL DE METILENO (EMB)

Peptona	10,0g
Lactose	10,0g
Fosfato dipotássico	2,0g
Eosina amarela (20mL da solução aquosa 2%)	0,4g
Azul de metileno (26mL da solução aquosa 0,25%)	0,065g
Ágar	15g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 7,1	

## ÁGAR XLD

Extrato de levedura	3,0g
L . lisina	5,0g
Xilose	3,75g
Lactose	7,5g
Sacarose	7,5g
Desoxicolato de sódio	2,5g
Citrato férrico amoniacal	0,8g
Tiosulfato de sódio	5,0g
Vermelho de fenol (40mL solução 0,2%)	0,08g
Ágar	15g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 7,4	

## ÁGAR TRÍPLICE AÇÚCAR DE FERRO (TSI)

Extrato de carne	3,0g
Extrato de levedura	3,0g
Peptona	15,0g
Proteose peptona	5,0g
Dextrose	1,0g
Lactose	10,0g
Sacarose	10,0g
Sulfato ferroso	0,2g

Cloreto de sódio	5,0g
Tiosulfato de sódio	0,3g
Vermelho de fenol (12mL da solução 0,2%)	0,024g
Ágar	12,0g

Diluir em 1000mL de água destilada  
pH 7,4

#### ÁGAR ENTÉRICO DE HECTOEN (HE)

Proteose peptona	12,0g
Extrato de levedura	3,0g
Sais biliares n°3	9,0g
Lactose	12,0g
Sacarose	12,0g
Salicina	2,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Tiosulfato de sódio	5,0g
Citrato férrico amoniacal	1,5g
Azul de bromotimol (32,5mL da solução 0,2%)	0,65g
Fucsina ácida	0,1g
Ágar	14,0g

Diluir em 1000mL de água destilada  
pH 7,5

#### ÁGAR LISINA DE FERRO (LIA)

Peptona	5,0g
Extrato de levedura	3,0g
Dextrose	1,0g
Cloridrato de L . lisina	10,0g
Citrato férrico amoniacal	0,5g
Tiosulfato de sódico	0,04g
Púrpura de bromocresol (2mL solução 1%)	0,02g
Ágar	15,0g

Diluir em 1000mL de água destilada  
pH 6,7

#### ÁGAR MANITOL GEMA DE OVO POLIMIXINA (MYP)

Extrato de carne	1,0g
Peptona	10,0g
D . manitol	10,0g
Cloreto de sódio	10,0g
Vermelho de fenol (12,5mL da solução 0,2%)	0,025g
Ágar	15,0g

Diluir em 1000mL de água destilada  
pH 7,1

### ÁGAR NUTRIENTE

Extrato de carne	3,0g
Peptona	5,0g
Diluir em 1000mL de água destilada	

### ÁGAR BAIRD PARKER

Caseína enzimática hidrolisada:	10g
Extrato de Carne:	5g
Extrato de Levedura:	1g
Glicina:	12g
Piruvato de Sódio:	12g
Cloreto de Lítio:	5g
Agar	20g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 7,0	

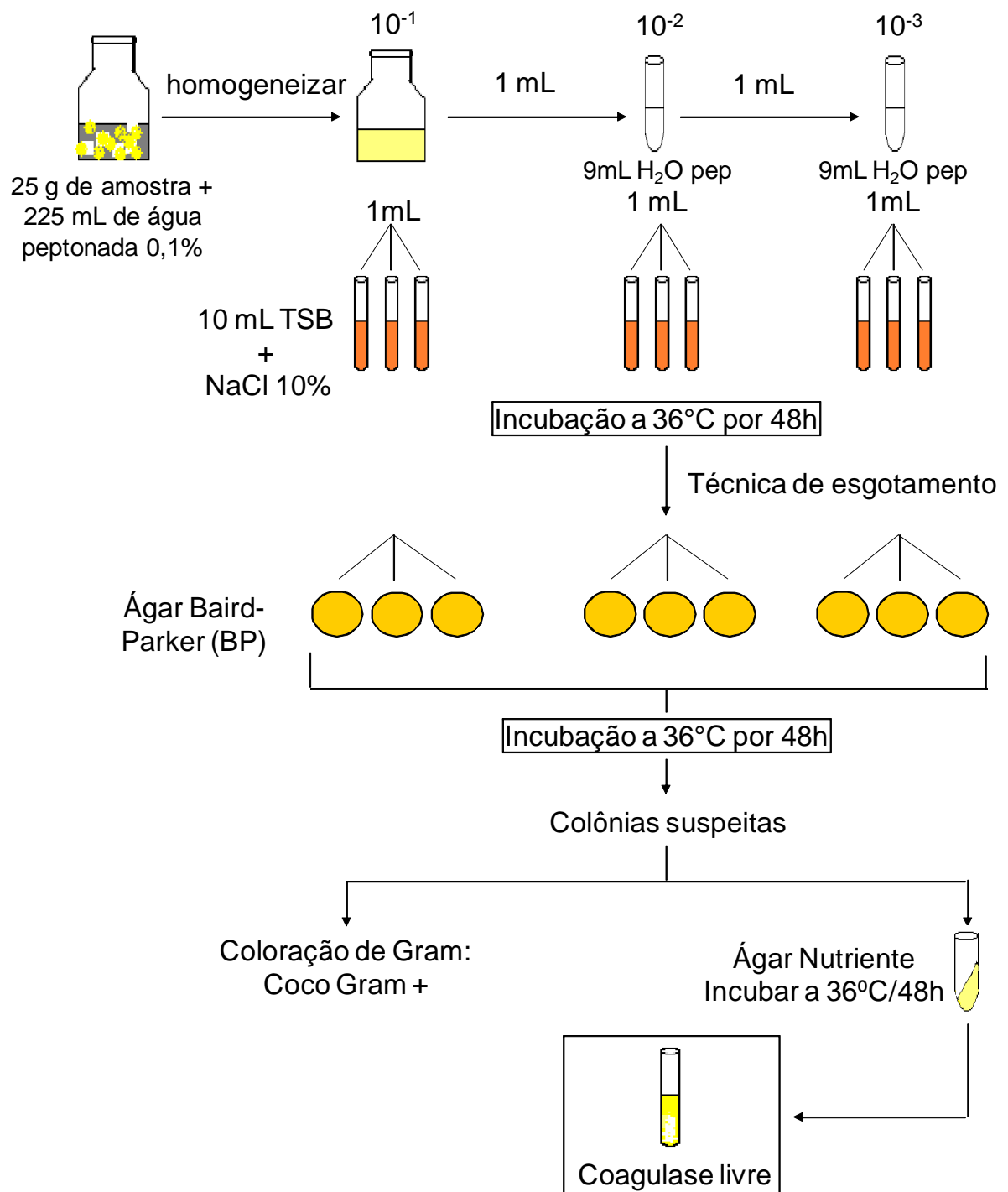
### ÁGAR SANGUE DE CARNEIRO

Caseína enzimática hidrolisada	14g
Digestão péptica de tecido animal	4,5g
Extrato de levedura	4.5g
Cloreto de sódio	5g
Ágar	12.5g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 7,3	

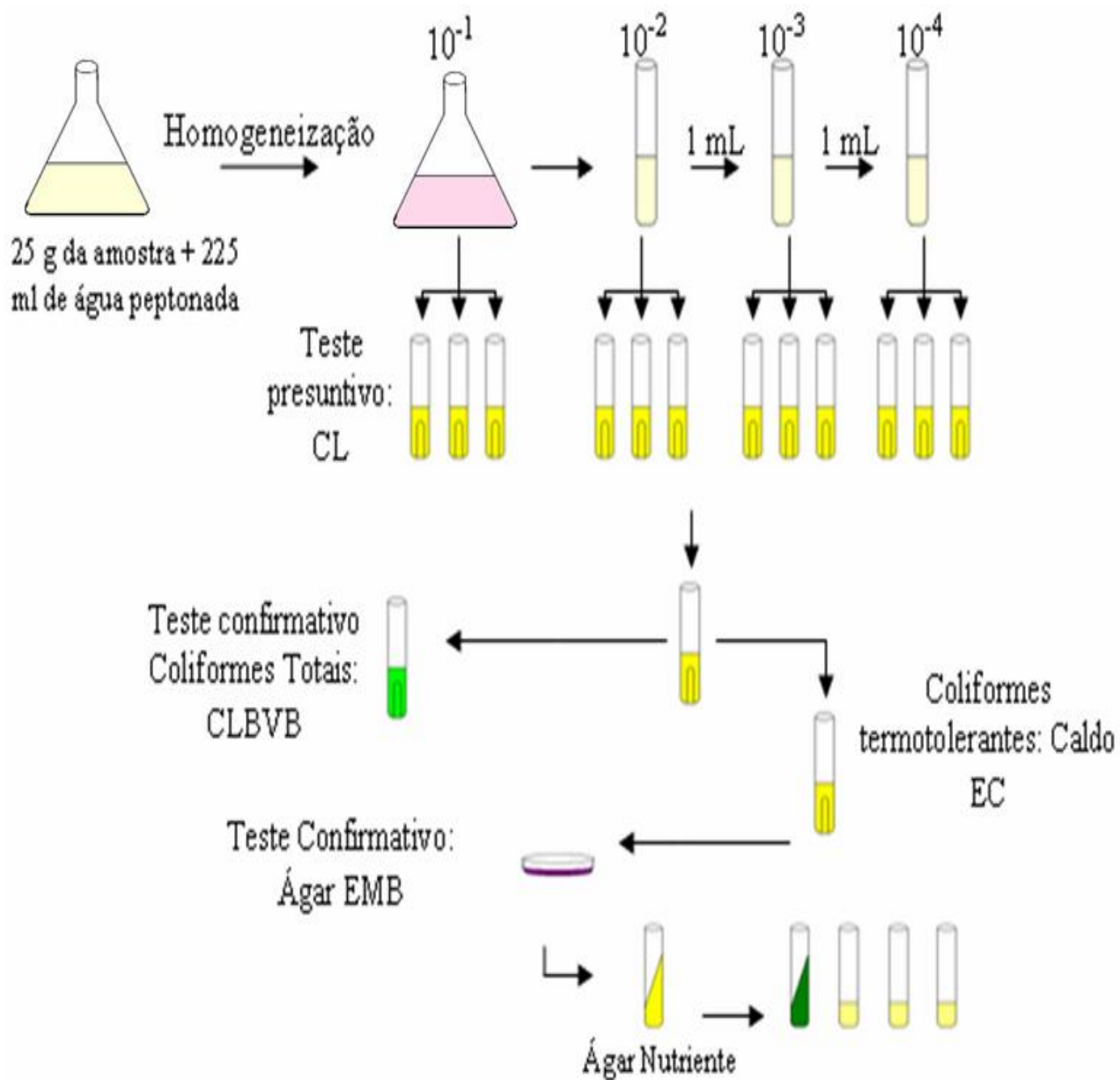
### ÁGAR CITRATO DE SIMMONS

Sulfato de Magnésio	0.20g
Fosfato de Amônio Diidrogênio	1.00g
Fosfato Dipotássico	1.00g
Citrato de Sódio	2.00g
Cloreto de Sódio	5.00g
Azul de Bromotimol	0.08g
Ágar	15g
Diluir em 1000mL de água destilada pH 7,0	

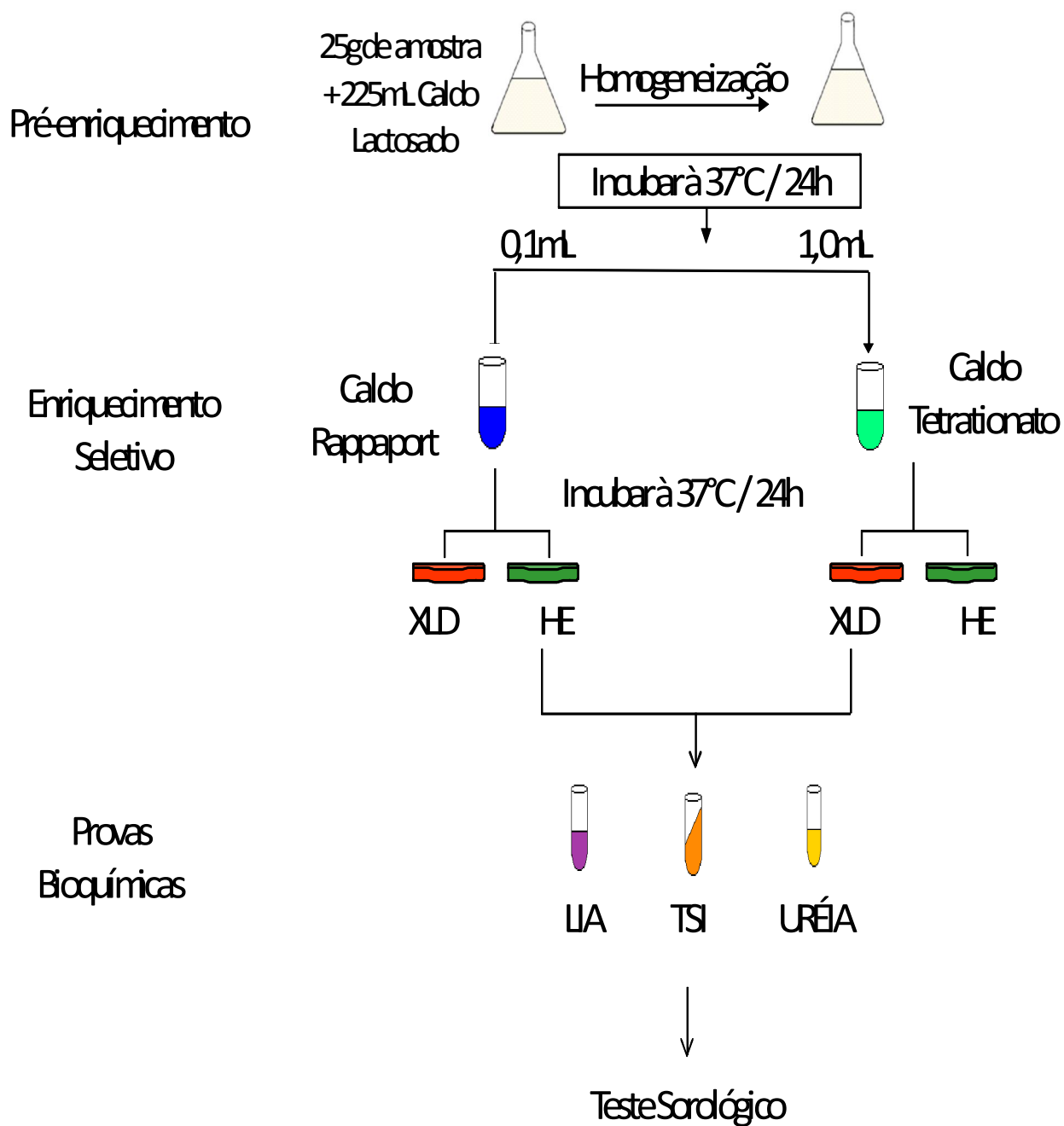
## 2. Contagem e confirmação de *Staphylococcus* coagulase positiva pelo método do Número Mais Provável (NMP)



### 3. Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes com identificação de *Escherichia coli*.



#### 4. Contagem e identificação de *Salmonella* spp.





## 5. Contagem e identificação de *Bacillus cereus*.

