



LUCAS COELHO BERNARDO



**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SANDUÍCHES NATURAIS
ARTESANAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

João Pessoa, PB

2018

LUCAS COELHO BERNARDO

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SANDUÍCHES NATURAIS
ARTESANAIS**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Janeeyre Ferreira Maciel

João Pessoa, PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B523a Bernardo, Lucas Coêlho.

Avaliação microbiológica de sanduíches naturais artesanais / Lucas Coêlho Bernardo. - João Pessoa, 2018.

52 f. : il.

Orientação: Janeeyre Ferreira Maciel.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCEN.

1. Análises microbiológicas. 2. Contaminação microbiana. 3. Produtos artesanais. 4. Segurança alimentar. I. Maciel, Janeeyre Ferreira. II. Título.

UFPB/BC

LUCAS COELHO BERNARDO

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE SANDUÍCHES NATURAIS
ARTESANAIS**

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas (Trabalho Acadêmico de Conclusão de Curso), como requisito parcial a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba.

Data: **06 / 11 / 2018**

Resultado: **APROVADO**

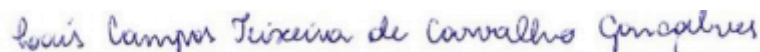
BANCA EXAMINADORA:



Prof^ª. Dr^ª. Janeeyre Ferreira Maciel, Departamento de Engenharia de Alimentos, UFPB.



Prof^ª. Dr^ª. Ana Flávia Santo Coelho, Departamento de Engenharia Química, UFPB.



Prof^ª. Dr^ª. Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves, Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira, UFPB.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Prof.^a Dr.^a Janeeyre Ferreira Maciel por ter não só me orientado nesse trabalho, mas também compartilhado do seu vasto conhecimento comigo. Obrigado a todos os integrantes da equipe de pesquisa, em especial Gessica Alexandre e Genilson Oliveira, que me auxiliaram e apoiaram durante esses últimos meses. Fico grato em compor a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Centro de Tecnologia, da UFPB.

Meus maiores sentimentos a turma 2014.2 do curso de Ciências Biológicas da UFPB, pelos ótimos momentos juntos e tristezas compartilhadas. Acredito que sem o companheirismo de Cleanne Limeira e Louise Fernandes, principalmente, meus dias não teriam sido satisfatórios e os objetivos alcançados. Bem como, Nathália Galvão e demais amigos que fiz durante o decorrer do curso, com a amizade solidificando a cada dia, tanto na ciência quanto na vida pessoal.

Também sou grato aos professores que tive durante os quatro anos dessa graduação, além dos que integrei em projetos de iniciação à docência e científica, em especial, Maria Cecília de Oliveira Campos, Gláucia Veríssimo Faheina-Martins, José Soares do Nascimento e Vinícius Pieta Perez.

Agradeço a minha família e parentes, em especial minha avó Walquíria Coelho e minhas tias-mães, Cristiana Coelho e Vera Lucia Coelho, por terem me apoiado em diversas decisões, além de chamar atenção quando fosse preciso e pelos variados momentos de apoio financeiro.

RESUMO

Os sanduíches naturais são considerados lanches práticos, rápidos e susceptíveis a contaminações por microrganismos patogênicos. A produção artesanal é preocupante devido ao contato direto na manipulação dos alimentos pela mão do manipulador, seleção de ingredientes com qualidade e ampla distribuição de venda. Assim, torna-se essencial que produtores e locais de comercialização sigam as normas propostas pela ANVISA. O objetivo desse trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de sanduíches naturais artesanais comercializados em lanchonetes na UFPB, a fim de verificar se os mesmos atendiam aos padrões microbiológicos exigidos na legislação brasileira. Foram coletados três sanduíches naturais artesanais de três diferentes lanchonetes (P-1, P-2 e P-3). Em seguida, as amostras de sanduíches naturais artesanais foram submetidas as seguintes análises microbiológicas: contagem padrão em placa, contagem de coliformes totais e termotolerantes pelo método do NMP e detecção de *Salmonella*. As contagens de bactérias totais em todas as amostras variaram de $7,2 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^8$ UFC/g, tendo o produto P-3 apresentado a menor variação entre repetições e valor máximo de $3,6 \times 10^5$ UFC/g. Na avaliação de coliformes totais, todos os produtos apresentaram contagens acima de 10^3 NMP/g, exceto para uma amostra do produto P-3, que obteve $2,4 \times 10^2$ NMP/g. Com relação a presença de coliformes termotolerantes, os três produtos avaliados apresentaram pelo menos uma amostra com contagem acima do limite máximo exigido (10^2 NMP/g) na RDC nº 12/01 da ANVISA. Na detecção de *Salmonella* spp., a presença foi observada somente em uma amostra do produto P-3, na qual, apresentou sensibilidade *in vitro* aos antibióticos usados comumente em prática clínica. Portanto, todos os sanduíches naturais artesanais obtiveram amostras com elevados números de coliformes termotolerantes, com presença de *Salmonella* spp. em um dos produtos artesanais e a maioria, contaminadas com bactérias mesófilas e coliformes totais em números elevados, demonstrando deficiências no processo de produção.

Palavras-chave: Análises microbiológicas. Contaminação microbiana. Produtos artesanais. Segurança alimentar.

ABSTRACT

Natural sandwiches are considered practical snacks, fast and susceptible to contamination by pathogenic microorganisms. Handmade production is worrisome due to direct contact in handling food by the hand of the manipulator, selection of ingredients with quality and wide distribution of sale. Thus, it is essential that producers and commercialization sites follow the standards proposed by ANVISA. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of artisanal natural sandwiches marketed in snack bars at UFPB, in order to verify if they met the microbiological standards required by Brazilian legislation. Three artisanal natural sandwiches were collected from three different snack bars (P-1, P-2 and P-3). The following microbiological analyzes were carried out on the samples of handmade natural sandwiches: standard plate count, total and thermotolerant coliforms by the NMP/g method and *Salmonella* detection. The mesophilic bacteria counts in all samples varied from 7.2×10^3 to 2.5×10^8 UFC/g, with the product P-3 having the lowest variation between replicates and a maximum value of 3.6×10^5 CFU/g. In the evaluation of total coliforms, all the products presented counts above 10^3 NMP/g, except for a sample of product P-3, that obtained 2.4×10^2 NMP/g. Regarding the presence of thermotolerant coliforms, the three evaluated products presented at least one sample with a count above the required maximum limit (10^2 NMP/g) in the RDC n° 12/01 of ANVISA. In the detection of *Salmonella* spp., the presence was observed only in a sample of the product P-3, in which, it showed sensitivity in vitro to the antibiotics commonly used in clinical practice. Therefore, all the artisanal natural sandwiches obtained samples with high numbers of fecal coliforms, with presence of *Salmonella* spp. one of the artisanal products and the majority, contaminated with mesophilic bacteria and total coliforms in high numbers, demonstrating deficiencies in the production process.

Keywords: Microbiological analyzes. Microbial contamination. Handmade products. Food safety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Série histórica de surtos e doentes por DTA no Brasil, entre 2000-2017 | 17 |
| Figura 2. Frequências dos surtos de DTA por regiões brasileiras, diagnosticadas entre os anos de 2007-2017 | 18 |
| Figura 3. Distribuição dos principais agentes etiológicos identificados entre os surtos de DTA no Brasil, nos anos de 2000-2017 | 18 |
| Figura 4. Atividade metabólica na hidrólise da enzima β -galactosidase, gerando galactose e glicose | 19 |
| Figura 5. <i>E. coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC) em roxo, aderidas as paredes intestinais | 22 |
| Figura 6. <i>Salmonella</i> spp. em diferentes visualizações | 23 |
| Figura 7. Sequência de etapas do mecanismo de infecção da <i>Salmonella</i> sp. no trato intestinal | 25 |
| Figura 8. Mecanismo de ação dos antimicrobianos sobre as células bacterianas | 26 |
| Figura 9. Principais mecanismos de resistência a antibióticos | 28 |
| Figura 10. Mapa do Campus I da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB | 31 |
| Figura 11. Meios XLD, HE e BS com colônias típicas de <i>Salmonella</i> spp | 42 |
| Figura 12. Controle positivo de colônias típicas de <i>Salmonella</i> spp | 43 |
| Figura 13. Cultura pura de <i>Salmonella</i> spp. em PCA | 45 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | |
|---|----|
| Quadro 1. Boas práticas na manipulação de alimentos contidas na RDC nº 216/04, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)..... | 16 |
| Quadro 2. Descrição das linhagens, mecanismos de patogenicidade e características das doenças causadas por <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| Quadro 3. Relação de meios de cultura, com sua finalidade de utilização e componentes de fórmula no cultivo de coliformes totais, termotolerantes, <i>Salmonella</i> spp. e sensibilidade microbiana | 32 |
| Tabela 1 - Descrição dos produtos artesanais, com principais ingredientes no recheio e respectivos prazos de validade | 39 |
| Tabela 2 - Contagens de bactérias mesófilas em sanduíches naturais artesanais, com valores expressos em unidade formadora de colônia (UFC/g)..... | 39 |
| Tabela 3 - Padrões microbiológicos de coliformes totais em sanduíches naturais artesanais, com valores expressos em número mais provável por grama (NMP/g) | 40 |
| Tabela 4 - Padrões microbiológicos de coliformes termotolerantes em sanduíches naturais artesanais, com valores expressos em número mais provável por grama (NMP/g)..... | 41 |
| Tabela 5 - Detecção de <i>Salmonella</i> spp. | 43 |
| Tabela 6 - Sensibilidade <i>in vitro</i> a antimicrobianos testados, com halos de inibição de crescimento em milímetros (mm)..... | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| ANVISA | Agencia Nacional de Vigilância Sanitária |
| APPCC | Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle |
| BS | Ágar Bismuto Sulfito |
| BVBL | Caldo Verde Bile Brillante Lactosado |
| DTAs | Doenças Transmitidas por Alimentos |
| EC | Meio <i>E. coli</i> |
| EHEC | <i>E. coli</i> entero-hemorrágica |
| EIEC | <i>E. coli</i> enteroinvasiva |
| EPEC | <i>E. coli</i> enteropatogênica clássica |
| ETEC | <i>E. coli</i> enterotoxigênica |
| H ₂ S | Sulfeto de Hidrogênio |
| HE | Ágar Hektoen Entérico |
| LIA | Ágar Lisina Ferro |
| LST | Caldo Lauril Sulfato Triptose |
| MH | Ágar Mueller-Hinton |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NMP/g | Número Mais Provável por grama |
| PCA | Ágar Padrão para Contagem |
| RDC | Resolução de Diretrizes Curriculares |
| RV | Caldo Rappaport-Vassiliadis |
| TGI | Trato Gastrointestinal |
| TSI | Ágar Tríplice Açúcar Ferro |
| TT | Caldo Tetracionato |
| UFC/g | Unidades Formadoras de Colônia por grama |
| UFPB | Universidade Federal da Paraíba |
| XLD | Ágar Base Xilose Lisina |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 14 |
| 2.1 | HÁBITOS ALIMENTARES FORA DO DOMICÍLIO | 14 |
| 2.2 | SANDUICHES NATURAIS ARTESANAIS | 14 |
| 2.3 | BOAS PRÁTICAS NA MANIPULAÇÃO DE ALIMENTOS | 15 |
| 2.4 | DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS | 16 |
| 2.5 | COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES..... | 19 |
| 2.6 | <i>Salmonella</i> spp..... | 22 |
| 2.7 | AGENTES ANTIMICROBIANOS | 25 |
| 2.8 | RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS | 27 |
| 2.9 | BIOFILMES BACTERIANOS | 28 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 30 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 30 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 30 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 | COLETA DAS AMOSTRAS..... | 31 |
| 4.2 | MEIOS DE CULTURA | 32 |
| 4.3 | PREPARO DAS AMOSTRAS | 35 |
| 4.4 | ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS | 35 |
| 4.4.1 | Contagem padrão em placas | 35 |
| 4.4.2 | Contagem de coliformes totais e termotolerantes pelo método do NMP..... | 36 |
| 4.4.3 | Detecção de <i>Salmonella</i> | 36 |
| 4.5 | TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS | 37 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 39 |
| 5.1 | AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS SANDUICHES NATURAIS ARTESANAIS..... | 39 |
| 5.2 | TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS | 44 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 47 |
| | REFERÊNCIAS | 48 |

1 INTRODUÇÃO

Os sanduíches naturais são considerados lanches práticos, rápidos e que rotineiramente vêm substituindo as refeições principais. Os mesmos podem apresentar recheios com ingredientes diversos tais como frango, queijos e hortaliças, dentre outros, podendo ser adicionado de maionese (MARTINS et al., 2016). Esses lanches naturais comercializados em estabelecimentos comerciais e nas ruas, com predomínio de produção artesanal, tornam-se alimentos susceptíveis a contaminações por microrganismos patogênicos (BEZERRA et al., 2017).

De acordo com a seleção dos ingredientes que compõem o recheio dos sanduíches naturais, podem ser preparadas diferentes formulações, sendo este um fator que contribui para a elevação no risco do consumo e dificulta ações de controle de qualidade para esses produtos. Com relação aos locais de produção artesanal, há bastante variação, podendo incluir padarias, lanchonetes, supermercados e até mesmo residências. Quanto à comercialização, pode ser feita no próprio local de produção, em estabelecimentos comerciais ou diretamente na rua, por meio de ambulantes, que mantêm os produtos geralmente em caixas isotérmicas, ficando os mesmos expostos por longos períodos, a temperaturas inadequadas (LEITE, 2016; ALVES et al., 2016).

Algumas ações são determinantes no controle do crescimento microbiano em sanduíches naturais. Dentre essas, destacam-se os cuidados com os ingredientes usados na formulação e com os procedimentos de higienização e manipulação (MACEDO et al., 2016).

Para os ingredientes, os cuidados mínimos devem envolver pelo menos verificação da procedência, controle de temperatura e tempo de armazenamento, respeitando seu prazo de validade, enquanto que para procedimentos de higienização é essencial usar produtos com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), assegurar-se da qualidade microbiológica da água e adotar procedimentos padronizados (ALVES et al., 2016; BRASIL, 2001). Ainda, é importante avaliar a saúde e higiene do manipulador e o local onde o alimento será preparado de modo a assegurar-se de que os mesmos sejam adequados. É importante ressaltar que todos esses cuidados estão inclusos na RDC nº 216/04 da ANVISA, sendo obrigatória sua adoção por qualquer empresa que atue na produção e comercialização de alimentos (SIRTOLI; COMARELLA, 2018; BRASIL, 2004).

Portanto, o uso de ingredientes de qualidade e a adoção de boas práticas de fabricação são medidas que irão contribuir para a obtenção de produtos seguros. Segundo a RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, sanduíches frios e similares devem apresentar os seguintes padrões microbiológicos: ausência de *Salmonella* spp. por 25 g de alimento, limite máximo de 10^2 NMP/g para coliformes termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e Clostrídios Sulfito Redutores, sendo esse último exigido quando os produtos forem adicionados de carnes ou de seus derivados (BRASIL, 2001).

Para prevenir a ocorrência de salmonelas em sanduíches naturais é preciso controlar a qualidade microbiológica dos ingredientes usados, especialmente em carnes de aves e derivados, que são considerados importantes alimentos transmissores desse patógeno (GARCIA; DUARTE, 2014). Outro ingrediente comumente envolvido em casos de surtos de salmoneloses é a maionese e o risco de transmissão de salmonela por esse ingrediente pode ser minimizado quando essa é obtida a partir de ovos pasteurizados, entretanto, a prática de elaboração de maionese com ovos crus aumenta bastante o risco de ocorrência de salmonelose (MARTINS et al., 2016; SANTOS-NETO, 2016). Os queijos também podem transmitir salmonelas, especialmente quando não são preparados a partir de leite pasteurizado (REIS et al., 2013). Por essa razão, é de grande importância controlar a qualidade dos ingredientes adquiridos e evitar a ocorrência desse patógeno nos produtos obtidos, o que inviabiliza sua comercialização (ALVES et al., 2016).

Com relação aos coliformes totais, sua ocorrência em números elevados pode ser considerada indicadora da sanitização do local onde os alimentos foram processados, manipulados ou comercializados (SOUZA; SANTOS; SANTOS, 2016), enquanto coliformes termotolerantes, especialmente *Escherichia coli*, são considerados importantes indicadores de contaminação dos alimentos com materiais de origem fecal, tendo a *E. coli* sido associada a diversos casos de diarreias em crianças e adultos. Para evitar a contaminação por essa bactéria algumas medidas de controle devem ser adotadas incluindo procedimentos higiênicos adequados, higienização das mãos antes de manipular alimentos cozimento dos alimentos a temperaturas superiores a 100 °C (TORTORA et al., 2017).

No Brasil, a negligência na segurança alimentar tem sido um agravante na Saúde Pública, aumentando as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) e a ocorrência de surtos, destacando-se os agentes etiológicos *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *E. coli*, com a região nordeste apresentando os menores números de surtos e doentes registrados (BRASIL, 2018).

Considerando que grande parte dos surtos alimentares globais é consequência de erros nas práticas de manipulação e estocagem dos alimentos, torna-se necessário aumentar a ação fiscalizadora de órgãos sanitários, realizar o controle microbiológico dos alimentos disponíveis ao consumo humano e difundir informações sobre adoção de boas práticas de fabricação e manipulação de alimentos, dentre outros (OLIVEIRA et al., 2013; SILVA et al., 2017).

Desta forma, faz-se necessário a pesquisa sobre a qualidade microbiológica de sanduíches naturais artesanais comercializados em lanchonetes na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), visando verificar os possíveis riscos microbiológicos no consumo humano.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HÁBITOS ALIMENTARES FORA DO DOMICÍLIO

O consumo de alimentos fora do domicílio tem sido reportado no Brasil, como uma prática que tem aumentado nos últimos anos. Esses hábitos alimentares têm sido maiores entre o grupo de homens do que mulheres, onde os adultos apresentam maior frequência do que adolescentes e idosos (QUEIROZ; COELHO, 2017). Os locais com maior frequência no consumo de alimentos prontos para consumo incluem lanchonetes, restaurantes e locais com serviço *fast food* (BEZERRA et al., 2017).

A partir do aumento de consumidores em lanchonetes e restaurantes, principalmente, observa-se que os alimentos produzidos e/ou comercializados por esses estabelecimentos, podem estar sujeitos à contaminação por microrganismos patogênicos. Ou a contaminação pode originar-se pelos próprios consumidores que falham nas práticas de boas condições de higiene, como lavar as mãos antes de tocar no alimento, ou ocorre devido à conservação irregular do produto pelo próprio estabelecimento (SILVA, 2012).

2.2 SANDUICHES NATURAIS ARTESANAIS

Os sanduíches naturais artesanais são lanches que apresentam ingredientes *in natura*, tais como pão (integral ou sírio), carnes (bovinas do tipo hambúrguer, frango desfiado ou patê de frango), hortaliças (alface, tomate, beterraba e/ou cenoura), derivados lácteos (queijos e/ou requeijão) e maioneses (SANTANA; VIEIRA; PINTO, 2015; ALVES et al., 2016; MARTINS; VIANA; COSTA, 2016; LEITE, 2016).

A seleção dos componentes no recheio dos sanduíches naturais recorrem atenção durante processos artesanais. As carnes e derivados de aves, como ovos e maioneses, são possíveis veículos para enteropatógenos, do mesmo modo para as hortaliças e laticínios crus, sem higienização padronizada ou que apresentem falhas no processo de pasteurização (GARCIA; DUARTE, 2014; MARTINS; VIANA; COSTA, 2016; SANTOS-NETO, 2016; REIS et al., 2013; ALVES et al., 2016).

O fato dos sanduíches naturais artesanais serem confeccionados a partir de contato e manipulação direta das mãos dos manipuladores, torna esses alimentos susceptíveis a presença de elevadas cargas microbianas. A contaminação dos alimentos artesanais pode

ser proveniente ao déficit dos processos de desinfecção, manipulação ou conservação durante a formulação dos ingredientes que compõem o recheio (BEZERRA et al., 2017). Além disso, os produtos artesanais demonstram atratividade econômica para o comércio e por isso, são amplamente distribuídos em pontos comerciais como lanchonetes, supermercados, padarias e restaurantes (LIMA; MIRANDA, 2007). Outros meios de comercialização dos sanduiches naturais são por *foodtrucks*, os quais apresentam menor fiscalização dos órgãos de vigilância e menor índice de pessoas treinadas para manipular alimentos prontos. Segundo Vilar (2017), os *foodtrucks* precisam de uma regulamentação própria por não terem pontos específicos e possivelmente, apresentam baixo controle durante a preparação e manipulação dos alimentos realizados na cozinha.

Com o aumento de produção e comercialização dos sanduiches naturais artesanais, aumentam as possibilidades desse tipo de alimento apresentar padrões microbiológicos e condições higiênico-sanitárias irregulares ao consumo humano (SOUZA; SANTOS; SANTOS, 2017). Nesse contexto aos órgãos fiscalizadores, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cabe realizar ações capazes de prevenir, diminuir ou eliminar riscos à saúde do consumidor e intervir nos problemas sanitários decorrentes (SIRTOLLI; COMARELLA, 2018).

2.3 BOAS PRÁTICAS NA MANIPULAÇÃO DE ALIMENTOS

As boas práticas na manipulação de alimentos foram descritas no Quadro 1, a partir da RDC nº 216/04, com objetivo de informar melhores práticas na manipulação e diminuir a incidência de doenças provocadas a partir do consumo de alimentos contaminados com patógenos (BRASIL, 2004).

Quadro 1. Boas práticas na manipulação de alimentos contidas na RDC nº 216/04, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

| Categoria | Descrição das boas práticas em alimentos |
|----------------------------------|--|
| Higiene pessoal | Assegurar que os manipuladores estejam com sua saúde íntegra, usem cabelos presos e cobertos com redes ou toucas, adotem hábitos regulares de lavar as mãos, evitando adornos e utilizando uniformes adequados; |
| Alimento ou matéria-prima | É necessário que o alimento ou sua matéria-prima sejam higienizados de forma adequada com água corrente tratada, conservado em temperaturas apropriadas, evitando a contaminação cruzada por utensílios domésticos e se cozido, garantir que todas as partes do alimento atinjam no mínimo 70 °C; |
| Local de trabalho | Deve estar limpo e organizado, obedecendo aos critérios mínimos de infraestrutura, com retirada do lixo frequente, além de manter o local iluminado, ventilado e protegido de insetos e outros animais. Bem como, utilizar apenas produtos de limpeza que contem no rótulo registro do Ministério da Saúde ou ANVISA; |
| Transporte | Se o alimento for produzido em local diferente ao comercializado, é preciso que durante o transporte, o alimento esteja armazenado em vasilhames e identificados com informações essenciais (nome do alimento, data de preparo e prazo de validade), ou ainda se o transporte for demorado, deve-se adotar procedimentos de transporte em caixas térmicas apropriadas; |
| Local de comercialização | Ao servir o alimento preparado, o local de comercialização deve garantir a limpeza da área dos consumidores; |
| Conservação do alimento | Na conservação dos alimentos preparados frios e quentes, é necessário empregar temperaturas de 5 °C e 60 °C, com prazos máximos de consumo em 5 dias e quentes 6 horas, respectivamente; |

Fonte: BRASIL, 2004.

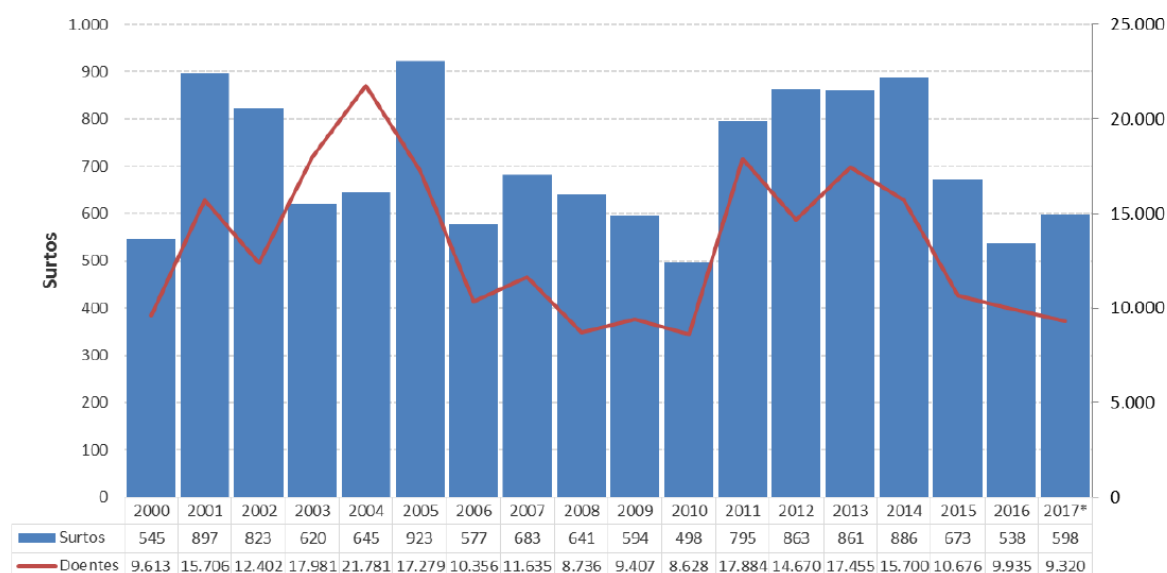
2.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são síndromes relacionadas a ingestão de alimentos ou água contaminados, em quantidades que comprometam a saúde

do consumidor á nível individual ou em grupos de populações. As DTAs podem ser causadas por agentes biológicos, produtos químicos e metais pesados. No Brasil, os surtos e o número de DTAs vêm decrescendo nos últimos quatro anos (Figura 1) (BRASIL, 2018).

Até 2017, a região sudeste tem ocupado o primeiro lugar no perfil epidemiológico pelos maiores surtos de DTAs (Figura 2). Os grupos atingidos majoritariamente incluem jovens, do sexo feminino, entre 10-29 anos de idade e os possíveis causadores são por ingestão de produtos cárneos e alimentos à base de ovos contaminados por agentes biológicos (BRASIL, 2018; GARCIA; DUARTE, 2014).

Figura 1. Série histórica de surtos e doentes por DTA no Brasil, entre 2000-2017.



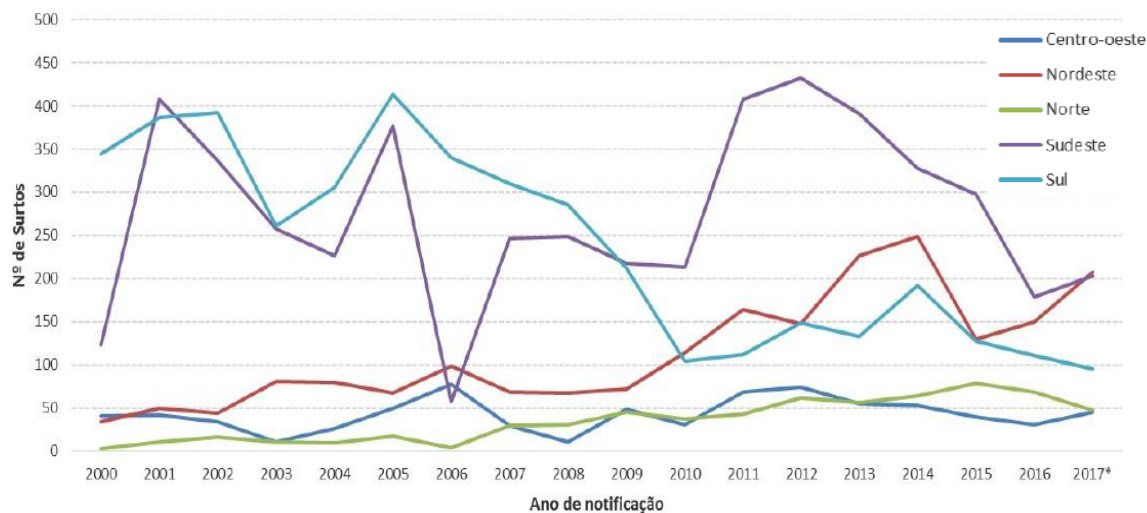
Fonte: Brasil, 2018.

Geralmente, o surto é registrando quando acomete um número grande de pessoas ou que apresentam sintomas severos. Assim, os órgãos responsáveis pela vigilância sanitária desempenham a função primordial de prever, manter e aumentar a qualidade de vida da população brasileira. Acredita-se que os surtos registrados de DTAs possam ser maiores do que os dados emitidos pelos bancos credenciados de órgãos responsáveis pela vigilância sanitária, pois ocorre deficiências na subnotificação (SIRTOLLI; COMARELLA, 2018).

De acordo com o Ministério da Saúde, no Brasil os agentes etiológicos de surtos de DTAs mais frequentes entre 2000-2017 foram causados por *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, Coliformes, *Bacillus cereus*, *Shigella* spp.,

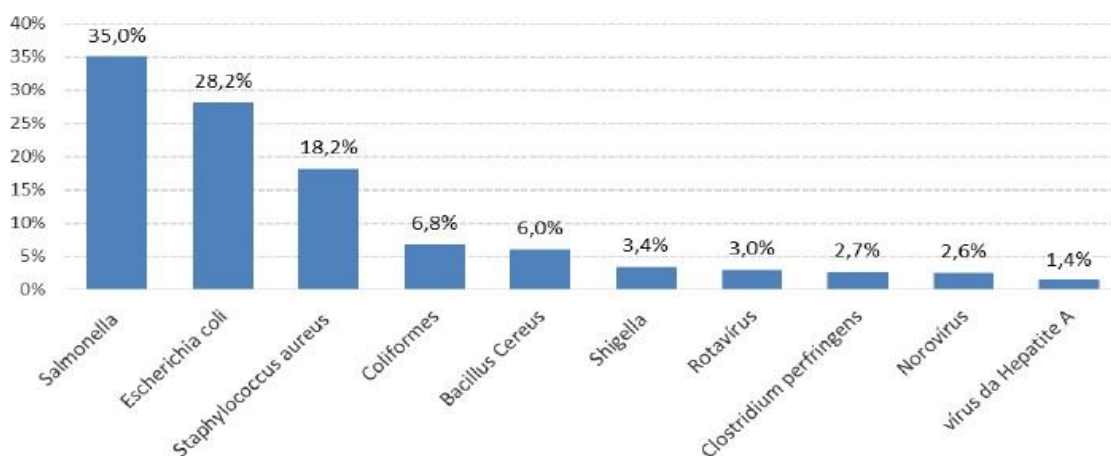
Rotavírus, *Clostridium perfringens*, Norovírus e vírus da Hepatite A (Figura 3) (BRASIL, 2018).

Figura 2. Frequências dos surtos de DTA por regiões brasileiras, diagnosticadas entre os anos de 2007-2017.



Fonte: Brasil, 2018.

Figura 3. Distribuição dos principais agentes etiológicos identificados entre os surtos de DTA no Brasil, nos anos de 2000-2017.



Fonte: Brasil, 2018.

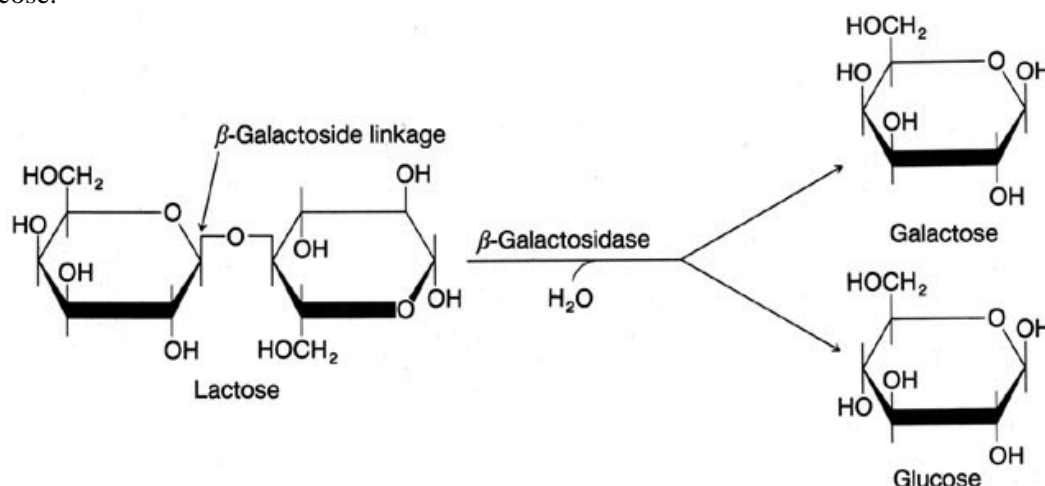
Os tipos de DTAs por agentes biológicos são essencialmente de dois tipos: infecções e intoxicações. Na infecção, o patógeno penetra o trato gastrointestinal (TGI) e se multiplica no local de origem ou migra para outros órgãos sistêmicos. Outros patógenos causam doenças a partir de toxinas, produzidas pelo microrganismo metabolicamente ativo, que afetam o TGI. Uma intoxicação é causada pela ingestão da toxina pré-formada e caracterizada pelo aparecimento súbito de distúrbios no TGI.

Ambas, infecções e intoxicações, frequentemente causam diarreia e se intensa com sangue ou muco, denomina-se disenteria, podendo acompanhar de cólicas abdominais, náuseas e vômitos. Ver-se que nos países em desenvolvimento, a diarreia é o principal fator da mortalidade infantil, onde aproximadamente uma criança em cada quatro morre antes dos cinco anos (TORTORA et al., 2017).

2.5 COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

Os coliformes são um grupo de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, Gram-negativas, em forma de bacilos e algumas fermentadoras de lactose em 35 ou 45 °C, pela hidrólise da enzima β -galactosidase (Figura 4) (TORTORA et al., 2017).

Figura 4. Atividade metabólica na hidrólise da enzima β -galactosidase, gerando galactose e glicose.



Fonte: Fischer, 2010.

Os representantes que compõem o grupo de coliformes são da família Enterobacteriaceae, tais como gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia*, entre outros. Os mesmos podem ser divididos em patógenos primários (como *Salmonella* spp.), que provocam doenças incessantemente após infeccionar o hospedeiro, ou oportunistas (por exemplo *E. coli*), causando doenças apenas em determinadas condições fisiológicas enquanto comensais (BAYLIS et al., 2011). Como a distribuição desses microrganismos é ampla, os coliformes totais abrangem enterobactérias que podem ser encontrados disseminados no ambiente. Para os gêneros que habitam exclusivamente o intestino de

hospedeiros mamíferos, são incluídos em coliformes termotolerantes, ou também chamados popularmente de termotolerantes, como *E. coli* (TORTORA et al., 2017).

Os coliformes totais mostram-se um grupo misto com diversidade de espécies ligadas, principalmente, a deterioração de alimentos e por isso, considerados potenciais indicadores de condições higiênica-sanitárias inadequadas (SANTANA; VIEIRA; PINTO, 2015).

Por mais que os coliformes termotolerantes contêm menor diversidade de gêneros entre enterobactérias, *E. coli* apresenta maior variação de linhagens patogênicas causadoras de infecção alimentar (Quadro 2) (CARVALHO, 2010).

Quadro 2. Descrição das linhagens, mecanismos de patogenicidade e características das doenças causadas por *Escherichia coli*.

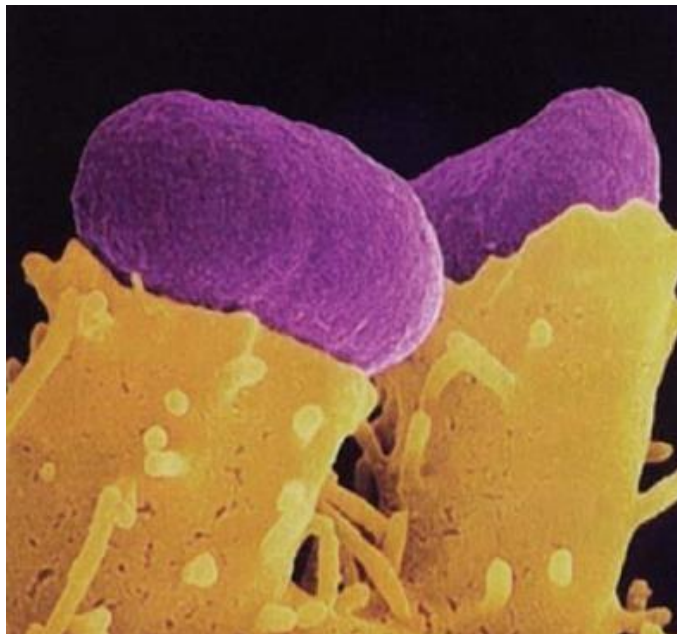
| Linhagem patogênica | Mecanismo de patogenicidade | Características da doença |
|---|---|--|
| <i>E. coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC) | Virulência associada à adesão a mucosa intestinal e destruição das microvilosidades das células epiteliais intestinais; | Manifesta dores abdominais, diarreia, vômitos e febre. Seu período de incubação varia de 17 a 72 horas; |
| <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC) | Penetra as células epiteliais e causa manifestações clínicas semelhantes a <i>Shigella</i> ; | Causa disenteria, cólicas abdominais, febre e mal-estar, com eliminação de muco e sangue nas fezes. Período de incubação é de 8-24 horas, com dose infectante entre 10^6 a 10^8 células; |
| <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC) | Produtora de enterotoxinas LT (termolábil) e ST (termoestável); | Em geral, manifesta-se com diarreia aquosa. Atinge pessoas de várias faixas etárias, onde as áreas de saneamento básico são precárias; |
| <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC) | Virulência associada à produção de citotoxina com destruição das microvilosidades, o que gera sangue nas fezes; | - |

Fonte: Carvalho, 2010.

Nos países tropicais, *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) demonstra maior incidência de surtos por DTAs (Figura 5). No Brasil, EPEC é responsável por acometer 30% dos casos de diarreia aguda em crianças em famílias com baixa renda e idades inferiores aos seis anos (CARVALHO, 2010). Enquanto a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) destaca-se por ser produtora da toxina Shiga, semelhante ao patógeno *Shigella dysenteriae*. Os bovinos destacam-se como hospedeiros assintomáticos da EHEC e a

carne moída é um potencial veículo de intoxicação para humanos quando contaminada pela Shiga (TORTORA et al., 2017).

Figura 5. *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) em roxo, aderidas as paredes intestinais.



Fonte: Tortora et al., 2017.

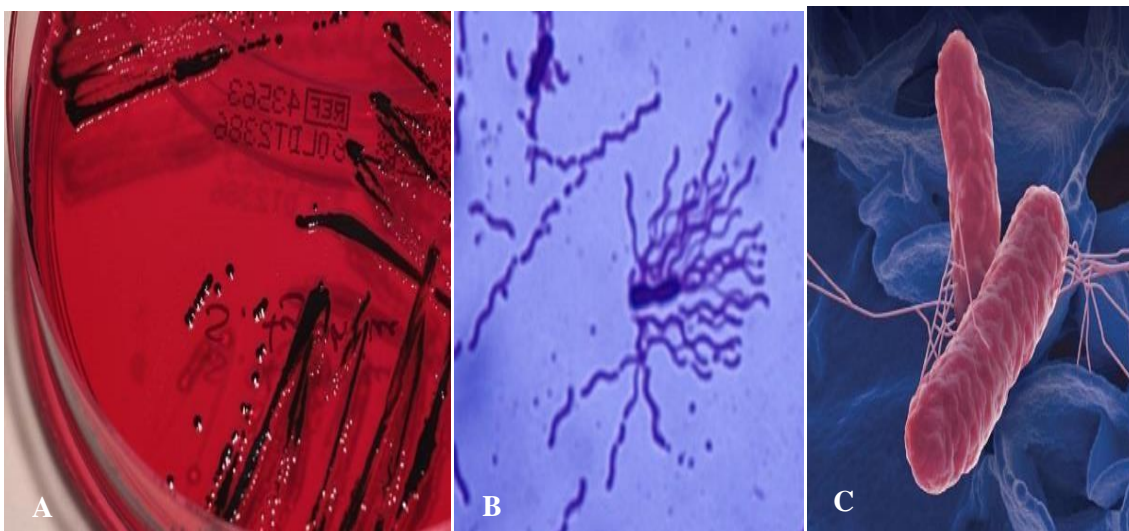
Para o tratamento de diarreias ou surtos de gastroenterites causadas por *E. coli*, o tratamento comum inclui uso de antibióticos e reidratação. Os métodos profiláticos mais comuns, fazem por procedimentos de higienização adequados das mãos e realizar cozimento dos alimentos acima de 100 °C (TORTORA et al., 2017).

2.6 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. são representantes da família Enterobacteriaceae, bacilos anaeróbios facultativos, produtores de sulfeto de hidrogênio (H₂S) e maioria se mostra flagelados (Figura 6). Apresentam pH ideal em 7, são sensíveis a concentrações de cloreto de sódio (NaCl) maiores que 9% e demonstram menor tempo de geração entre 35-37 °C. A presença da enzima cisteína desulfurase atribui a capacidade desse microrganismo produzir H₂S a partir da redução de aminoácidos sulfurados ou compostos sulfurados inorgânicos. Outras características metabólicas, envolvem a capacidade de *Salmonella* spp. descarboxilar aminoácidos como lisina e ornitina, bem como, reduzir nitrito a nitrato

e utilizar citrato como principal fonte de carbono (CARVALHO, 2010; CHLEBICZ; SLIZEWSKA, 2018).

Figura 6. *Salmonella* spp. em diferentes visualizações.



(A) *Salmonella enteritidis* sorotipo Typhimurium em ágar seletivo; (B) Microscopia óptica de *Salmonella enteritidis* sorotipo Typhi para visualização de flagelos; (C) Microscopia eletrônica de varredura de *Salmonella* sp. Fonte: Cangussu, 2016.

Em geral, a nomenclatura para espécies de *Salmonella* é complexa e permanece inconsistente nos aspectos taxonômicos, mas são reconhecidas três espécies: *S. enterica*, *S. bongori* e *S. subterranea*. O gênero *Salmonella* é dividido em sete subespécies, sendo baseado em critérios de habitat usual, aspectos bioquímicos e condições genéticas. Há cerca de 2500 sorovares, diferenciados pelas estruturas dos lipopolissacarídeos presentes na membrana externa da célula bacteriana (CHLEBICZ; SLIZEWSKA, 2018).

Sabe-se que os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* se mostram adaptadas a aves de produção comercial, inviabilizando sua carne para comercialização quando infectados e algumas vezes, provocam contaminação dos ovos. Nos produtos agrícolas, como hortaliças e frutas, a contaminação *Salmonella* spp. pode originar-se de material fecal ou por águas correntes contaminadas (TORTORA et al., 2017).

Quando comparadas aos outros bastonetes Gram-negativos, *Salmonellas* spp. mostram-se relativamente resistentes a fatores ambientais. Além de demonstrarem adaptação fisiológica entre valores de pH 7.0-7.5 (entre 3.8-9.5), temperatura de 35-43 °C (extremos 5-46 °C) e uma atividade hídrica ($\geq 0,94$), o que pode variar entre sorovares e/ou cepas. *Salmonella* spp. apresentam sensibilidade a temperaturas superiores de 70 °C,

porém essa propriedade de termorresistência é influenciada pelo menor coeficiente de atividade de água disponível no alimento. Esse patógeno apresenta resistência a processos de dessecação, congelamento, salmoura e defumação. Em condições ácidas, os efeitos bactericidas dos agentes químicos variam de acordo com a natureza do ácido utilizado no processo de controle, sendo o ácido acético e propiônico maior inibição sobre o tempo de geração de *Salmonella* spp., do que o ácido láctico e cítrico (BRASIL, 2011).

A partir de cada interação entre *Salmonella* spp. e hospedeiro, pode ocorrer modificações em ambos, as quais favorecem o patógeno. Esse fenômeno envolve mecanismos correlacionados as ilhas de patogenicidade, causado por genes cromossômicos e plasmidiais. Sabe-se que a dinâmica bacteriana, após cada infecção, gera alterações genômicas e proteômicas que aumentam o risco de patogenicidade do agente etiológico no hospedeiro. Consequentemente, ocorre alterações nos perfis epidemiológicos devido as modificações de *Salmonella* spp., tornando-se agravante a saúde veterinária e humana (OLIVEIRA et al., 2013).

O mecanismo de infecção por *Salmonella* spp., inicia-se no momento em que o patógeno atinge o TGI, penetra a mucosa pelas células M e se multiplica, podendo alcançar o linfonodo e posteriormente, infectar células presentes na corrente sanguínea (Figura 7). O período de incubação do patógeno varia entre horas e dias, dependendo do número de células ingeridas e sorovar, os quais são acometidos grupos de riscos crianças e idosos. Em geral, as salmoneloses são doenças causadas por *Salmonella* spp., podendo desenvolver quadros clínicos de febre não tifoide (gastroenterite) ou febre tifoide. (TORTORA et al., 2017).

As gastroenterites bacterianas são causadas por sorovares de *S. entérica*, transmitidos por consumo direto de alimentos ou animais contaminados, tais como carnes (bovina e avícola), leites crus, ovos e derivados, bem como águas não tratadas. O período de incubação do patógeno nas gastroenterites varia entre 12-36 horas, com sintomas que incluem dores abdominais, diarreias e vômitos. No tratamento, é feito a reidratação e repouso dos indivíduos aos casos leves, e se persistentes, deve-se adequar ao uso de antibióticos (BUSH; PEREZ, 2018).

Figura 7. Sequência de etapas do mecanismo de infecção da *Salmonella* sp. no trato intestinal.



Fonte: Tortora *et al.*, 2017.

Aproximadamente entre 400-500 casos são reportados anualmente nos Estados Unidos de febre tifoide, sendo os hospedeiros humanos os únicos acometidos por água e alimentos contaminados por *S. typhi* ou por fezes de portadores desse patógeno, com período de incubação de 8 a 10 dias e tratamento apenas por antibióticos. Durante o tratamento, é observado a resistência a antibióticos, principalmente, de áreas endêmicas (BUSH; PEREZ, 2018).

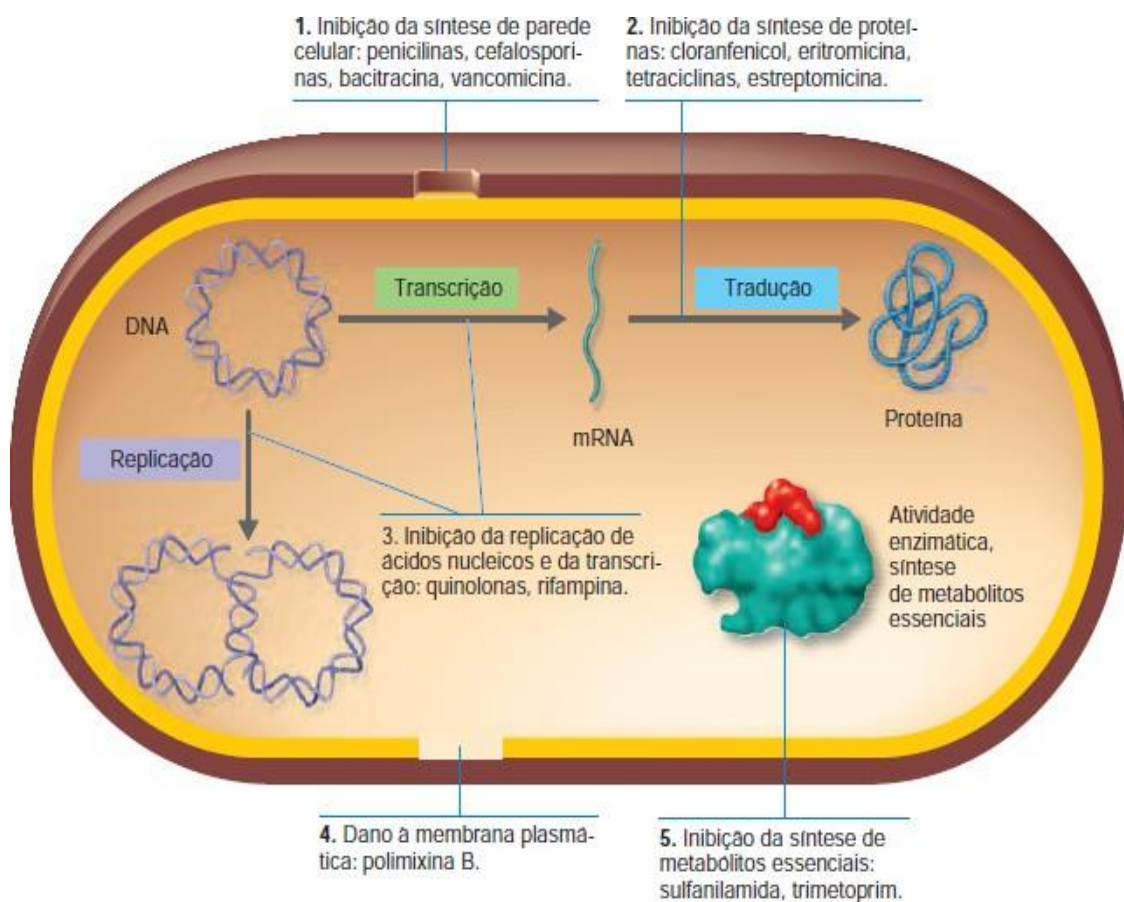
2.7 AGENTES ANTIMICROBIANOS

Os agentes antimicrobianos exercem efeitos bactericidas ou bacteriostáticos sobre os micróbios, sendo classificados quanto ao mecanismo de ação. Os agentes bactericidas

exercem efeito letal na célula bacteriana, matando diretamente. Enquanto os agentes bacteriostáticos, inibem o crescimento da célula bacteriana (TORTORA et al., 2017).

Segundo Guimarães, Momesso e Pupo (2010) os antibióticos podem ser formulados por substâncias naturais de microrganismos, semissintéticas ou exclusivamente sintéticas. Os mecanismos de ação dos antibióticos provocam efeitos bacteriostáticos ou bactericidas nas células bacterianas, tais quais, inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular (β -lactâmicos), bloquear o processo de tradução, impedir a replicação dos ácidos nucleicos, gerar danos a membrana plasmática ou inibir a síntese de metabólitos essenciais (Figura 8).

Figura 8. Mecanismo de ação dos antimicrobianos sobre as células bacterianas.



(1) inibidores de síntese da parede celular, (2) inibidores do processo de tradução, (3) inibidores da replicação dos ácidos nucleicos, (4) danos a membrana plasmática e (5) inibidores da síntese de metabólitos essenciais. Fonte: Tortora et al., 2017.

As bactérias Gram negativas são mais resistentes a ação dos antibióticos por apresentarem membrana externa a parede celular. Por isso, a natureza química da molécula de antibiótico deve cruzar a parede celular por canais de porinas, nesses grupos.

No tratamento de infecções por enterobactérias, são usados antibióticos β -lactâmicos (como ampicilina e cefalosporina, cujo alvo é a enzima transpeptidase), cloranfenicol (bloqueia subunidades ribossômicas) e Sulfonamidas/trimetoprim (agentes bacteriostáticos sinérgicos que atuam como antimetabólitos do ácido *p*-aminobenzoico) (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; TORTORA et al., 2017).

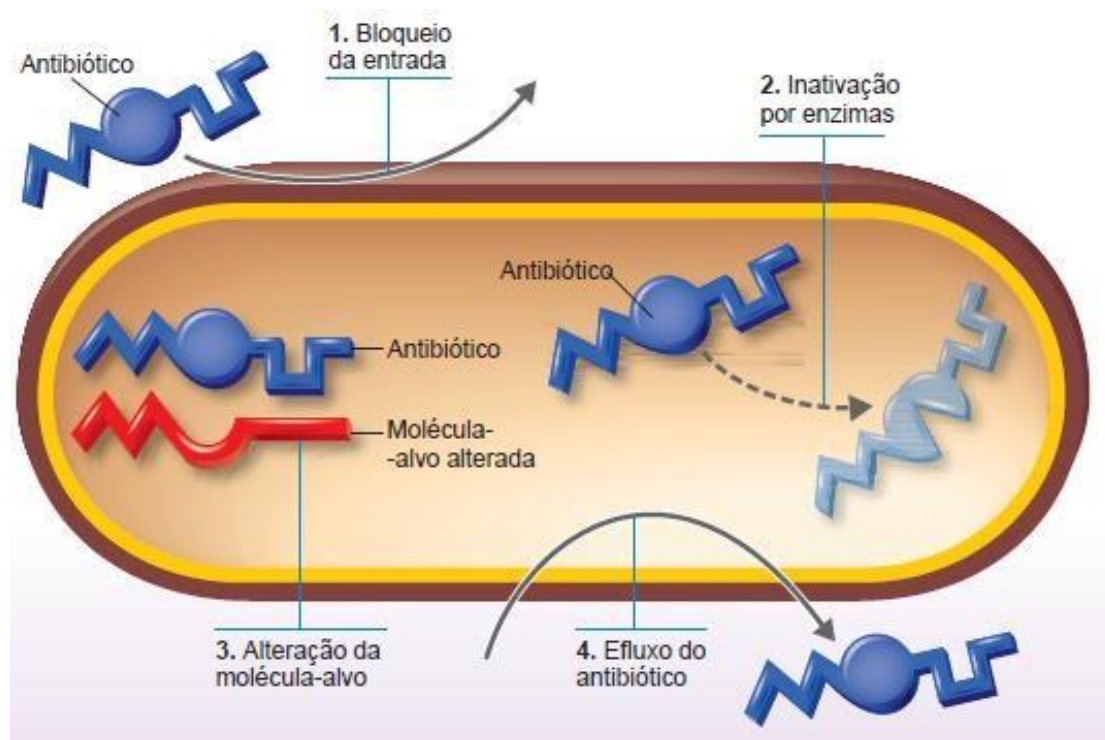
2.8 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

A resistência dos micróbios aos antibióticos usados comumente na prática clínica humana e veterinária, tem sido uma dificuldade a se superar. Durante o primeiro contato de uma população bacteriana ao antibiótico, maior parte das células sofrem pelo efeito bactericida. Porém, algumas outras células bacterianas sobrevivem e assumem características genéticas que aumentam sua taxa de sobrevivência, transmitindo essa vantagem para as próximas gerações. Sabe-se que a resistência por parte dos microrganismos gera custo biológico e perda de energia para reprodução, também conhecido como *fitness*. Através de mecanismos compensatórios, as bactérias tendem a reverter sua resistência a antibióticos para diminuir o custo biológico e aumentar a taxa do seu *fitness* (ALÓS, 2015; COSTA; SILVA-JUNIOR, 2017).

Os mecanismos de variação genética que contribuem para a resistência bacteriana são oriundos de fenômenos como mutação, recombinação, transposição ou troca de material genético. A partir de tratamentos com concentrações subinibitórias de antibióticos nos hospedeiros infectados por bactérias patogênicas, pode facilitar no processo de resistência a antibióticos. Esse mecanismo é induzido por em resposta ao estresse produzido nas células bacterianas pelos antibióticos, contribuindo para a capacidade natural de transformação e recrutamento de genes de resistência (ALÓS, 2015).

Geralmente, resistência a drogas está ligada a transferência horizontal por plasmídeos, os quais podem se autoduplicar independente do genoma bacteriano e ser compartilhado por conjugação. Dentre os mecanismos de resistência aos antibióticos, são relatados bloqueios da entrada da droga na célula, inativação da droga por enzimas, ocorrência de alteração nos sítios-alvo e efluxo celular da droga (Figura 9) (TORTORA et al., 2017).

Figura 9. Principais mecanismos de resistência a antibióticos.



(1) bloqueio de entrada, (2) inativação de enzimas, (3) alteração da molécula-alvo e efluxo do antibiótico. Fonte: Tortora *et al.*, 2017.

2.9 BIOFILMES BACTERIANOS

Através dos biofilmes microbianos, as células de diferentes espécies de microrganismos podem interagir em um microambiente, aderidas a superfícies e envoltas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares. A formação dos biofilmes em locais de processamento de alimentos, inicia-se a partir da proliferação de microrganismos em pontos estratégicos a presença de resíduos proteicos, lipídicos ou por carboidratos provenientes de produtos derivados lácteos e cárneos. Assim, os biofilmes bacterianos podem ser formados em equipamentos ou utensílios domésticos, devido a falhas em processos de higienização e aumentando as chances de contaminação cruzada (OLIVEIRA; BRUGNEIRA; PICCOLI, 2010; GIAOURIS *et al.*, 2015). Dentre as bactérias patogênicas, são evidenciados *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* como formadores de biofilmes microbianos em superfícies abióticas e bióticas (GIAOURIS *et al.*, 2015).

Os mecanismos de resistência aos agentes microbianos proporcionam as células presentes no biofilme bacteriano maior chance de sobrevivência e diminuem sua sensibilidade a substâncias inibitórias que interferem em seu metabolismo. A resistência

pode surgir por uso incorreto dos agentes, por exemplo, com quantidades inferiores ao exigido do antimicrobiano. Outro fator que pode atribuir resistência é relacionado a densidade populacional e a diversidade de espécies que compõem os biofilmes bacterianos, as quais as células resistentes tendem a proteger as sensíveis durante a aplicação dos agentes (OLIVEIRA; BRUGNEIRA; PICCOLI, 2010). A virulência nos biofilmes mistos também se deve as interações intraespecíficas e interespecíficas que ocorrem na comunidade bacteriana, as quais são capazes de compartilhar fatores fisiológicos, atribuindo a resistência aos antimicrobianos (GIAOURIS et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a qualidade microbiológica de sanduíches naturais artesanais comercializados em lanchonetes na UFPB, Campus I, a fim de verificar se os mesmos atendiam aos padrões microbiológicos exigidos na legislação brasileira.

3.2 ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar a contagem padrão em placas de bactérias mesófilas aeróbias e contagem de coliformes totais e termotolerantes em amostras de sanduiches naturais artesanais;
- ❖ Realizar uma pesquisa de *Salmonella* em amostras de sanduiches naturais artesanais;
- ❖ Comparar os resultados obtidos com padrões da legislação brasileira e com dados da literatura pesquisada;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de sanduíches naturais obtidos por processo artesanal foram adquiridas mediante compra em lanchonetes dentro da UFPB, na cidade de João Pessoa - PB, durante o período de agosto a setembro de 2018 (Figura 10). Os pontos de coleta foram escolhidos devido a disponibilidade de amostras e representam locais de fluxo intenso de estudantes diariamente.

Figura 10. Mapa do Campus I da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.



(2) CCHLA, (4) CCEN e (11) CE representam locais de coleta dos sanduíches naturais artesanais. Fonte: UFPB.

Para cada produto, foram coletadas 3 unidades de amostras de diferentes lotes, resultando em 9 unidades de sanduíches naturais artesanais coletadas. Todas as amostras foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Centro de

Tecnologia da UFPB, em caixas isotérmicas contendo gelo, num prazo máximo de 30 minutos.

4.2 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados atuaram no enriquecimento, isolamento e na diferenciação de microrganismos patogênicos em alimentos tais como Água Peptonada, Caldo Lactose, Ágar para Contagem, Caldo Rappaport-Vassiliadis, Caldo Tetracionato, Caldo Lauril Sulfato Triptose, Meio *E. coli*, Caldo Verde Bile Brillhante Lactosado, Ágar Bismuto Sulfito, Ágar Hektoen Entérico, Ágar Tríplice Açúcar Ferro, Ágar Lisina Ferro e Ágar Mueller-Hinton.

Quadro 3. Relação de meios de cultura, com sua finalidade de utilização, grupo aplicado e componentes de fórmula no cultivo de coliformes totais, termotolerantes, *Salmonella* spp. e sensibilidade microbiana.

| Meio de cultura | Finalidade | Composição química |
|-------------------------------------|---|---|
| Água Peptonada | Cultivo de microrganismos não exigentes; | Peptona, Cloreto de sódio (NaCl); |
| Ágar Padrão para Contagem (PCA) | Contagem bacteriana; | Caseína pancreática digerida, Extrato de levedura, Glicose, Agar e Água deionizada; |
| Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) | Detecção de coliformes; | Digestão enzimática de caseína, lactose, Cloreto de sódio, Fosfato monopotássico, Fosfato dissódico, Lauril sulfato de sódio; |
| Meio <i>E. coli</i> (EC) | Detecção de coliformes a 37°C e <i>E. coli</i> em temperaturas de 44,5 ± 1°C; | Triptose, Lactose, Mistura de sais biliares, Fosfato dipotássico, Fosfato monopotássico, Cloreto de sódio; |

| | | |
|---|---|---|
| Caldo Verde Bile Brilhante Lactosado (BVBL) | Detecção de coliformes; | Digestão enzimática de gelatina, Lactose, Bile bovina, Verde brilhante; |
| Caldo Lactose | Cultivo de <i>Salmonella</i> e coliformes; | Digestão enzimática de gelatina, Extrato de carne bovina, Lactose; |
| Caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) | Enriquecimento e isolamento seletivo de <i>Salmonella</i> spp.; | Peptona da soja, Cloreto de sódio, Fosfato de potássio monobásico, Fosfato de potássio dibásico, Cloreto de magnésio anidro, Verde malaquita; |
| Caldo Tetracionato (TT) | Enriquecimento seletivo para o cultivo de <i>Salmonella</i> spp.; | Digestão enzimática de caseína, Digestão enzimática de tecido animal, Sais biliares, Carbonato de cálcio, Tiosulfato de sódio; |
| Ágar Bismuto Sulfito (BS) | Isolamento seletivo de <i>Salmonella</i> spp.; | Digestão enzimática de caseína, Digestão enzimática de tecido animal, Extrato de de carne bovina, Dextrose, Fosfato dissódico, Sulfato ferroso, Indicador Bismuto Sulfito, Verde brilhante, Ágar; |

| | | |
|----------------------------------|---|--|
| Ágar Hektoen Entérico (HE) | Isolamento e diferenciação de patógenos entéricos; | Digestão enzimática de tecido animal, Extrato de levedura, Mistura de sais biliares, Lactose, Sacarose, Salicina, Cloreto de sódio, Tiosulfato de sódio, Citrato férrico amoniacal, Azul de bromotimol, Fucsina ácida, Ágar; |
| Ágar Base Xilose Lisina (XLD) | Isolamento e diferenciação de patógenos entéricos; | Extrato de levedura, Lactose, Sacarose, Xilose, L-lisina, Citrato Férrico Amoniacal, Vermelho de Fenol, Cloreto de sódio, Desoxicolato de sódio, Tiosulfato de sódio, Ágar; |
| Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) | Diferenciação de micro-organismos baseada na fermentação de dextrose, lactose e sacarose e produção de sulfeto de hidrogênio; | Digestão enzimática de caseína, Digestão enzimática de tecido animal, Levedura enriquecida com Peptona, Dextrose, Lactose, Sacarose, Citrato férrico amoniacal, Cloreto de sódio, Vermelho de Fenol, Ágar; |
| Ágar Lisina Ferro (LIA) | Meio diferencial para identificação de bacilos entéricos; | Digerido pancreático de gelatina, Extrato de levedura, Dextrose, L-lisina, Citrato de amônio férrico, Tiosulfato de sódio, Púrpura de bromocresol, Ágar; |

| | | |
|--------------------------|--|--|
| Ágar Mueller-Hinton (MH) | Utilizado em testes de susceptibilidade antimicrobiana através do método de difusão em disco | Extrato de carne bovina, Hidrolisado ácido de caseína, Amido e Ágar; |
|--------------------------|--|--|

Fonte: Autor, 2018.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Porções de 25 g do recheio de cada sanduíche natural artesanal foram transferidas para um frasco contendo 225 mL de Água Peptonada 0,1%, formando a diluição 10^{-1} . Após homogeneização, alíquota de 1 mL do frasco foi transferida para um tubo contendo 9 mL do mesmo diluente, formando a diluição 10^{-2} . Após homogeneização do tubo, alíquota de 1 mL foi transferida para outro tubo contendo 9 mL do mesmo diluente, formando a diluição 10^{-3} . Esse procedimento foi repetido até a obtenção da diluição 10^{-6} , tendo sido usadas diferentes diluições de amostras, de acordo com a análise microbiológica realizada. Para a detecção de *Salmonella* spp., foi necessária a utilização de uma segunda porção de 25 g do recheio de cada amostra, sem diluição.

4.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Amostras de sanduiches naturais artesanais foram submetidas as seguintes análises microbiológicas: contagem padrão em placas, contagem de coliformes totais e termotolerantes pelo método do Número Mais Provável por grama (NMP/g) e detecção de *Salmonella*.

4.4.1 Contagem padrão em placas

Alíquotas de 1 mL das diluições selecionadas de cada amostra (10^{-2} a 10^{-6}) foram semeadas em placas de Petri, previamente esterilizadas e identificadas, em duplicata. Em seguida, foi adicionado cerca de 15-20 mL de PCA fundido e mantido a 45°C . Após homogeneização do meio de cultura com o inóculo e posterior solidificação, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 35°C por 48 horas.

Ao final do período de incubação, a leitura das placas que continham entre 25 e 250 colônias foi realizada com auxílio de um contador de colônias, e o resultado médio de cada amostra foi obtido, com base nas regras de contagem estabelecida na metodologia adotada do Manual de Análise Bacteriológica. O resultado final foi expresso em unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) (BAM, 2018).

4.4.2 Contagem de coliformes totais e termotolerantes pelo método do NMP

A contagem de coliformes foi realizada em duas etapas denominadas fase presuntiva e fase confirmativa.

Na fase presuntiva, foram transferidas alíquotas de 1 mL de cada diluição selecionada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) para uma série de três tubos de ensaio, previamente identificados, contendo 9-10 mL de meio LST com tubos de Durham invertidos em seu interior. Posteriormente, os mesmos foram incubados em estufa a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 2 h, sendo considerados positivos os tubos que continham gás no interior de tubo de Durham ou apresentaram efervescência quando levemente agitados.

Na fase confirmativa, foi transferida uma alçada da suspensão contida em cada tubo positivo de caldo LST, para tubos contendo 9-10 mL do BVBL e EC, para confirmação de coliformes totais e coliformes termotolerantes, respectivamente. Após inoculação, os tubos de BVBL foram incubados em estufa a $35 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e os tubos de EC em banho-maria a $45,5 \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ambos por um período de 24 ± 2 h. Posteriormente, foi realizada a leitura dos tubos positivos nas três diluições consecutivas para determinação do NMP, obtido por meio de consulta a tabela de referência (BAM, 2018).

4.4.3 Detecção de *Salmonella*

A detecção de *Salmonella* spp. foi executada nas seguintes etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento diferencial e confirmação preliminar (BAM, 2018).

No pré-enriquecimento, foram adicionados 25 g do recheio de cada sanduíche natural em um recipiente contendo 225 ml de Caldo Lactose deixado em temperatura ambiente por 60 ± 5 minutos e incubado posteriormente a $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas.

Após a incubação, a etapa de enriquecimento seletivo consistiu na transferência de 0,1 mL e 1 mL das amostras, obtidas do pré-enriquecimento, para tubos de ensaio contendo

10 mL dos meios RV e TT, respectivamente. Antes de iniciar essa última etapa, o TT foi acrescido com 0,1 mL de verde brilhante e 0,2 mL de iodo. Em seguida, incubou-se os tubos com TT em estufa a 35 ± 2 °C e RV em banho maria a $42 \pm 0,2$ °C, durante 24 ± 2 horas.

Para o isolamento diferencial, uma alçada foi transferida de cada um dos tubos usados no enriquecimento seletivo, para placas contendo os seguintes meios de cultura: XLD, HE e BS. Após semeadura, as placas foram incubadas invertidas na estufa a 35 ± 2 °C por 24 horas. Para o BS, se não houver crescimento em 24 horas, poderá ser reencubado por até 48 horas.

Para confirmação preliminar, foram repicadas duas colônias suspeitas de salmonela a partir de cada meio de cultura usado no isolamento diferencial para tubos com TSI e LIA inclinados. Em ambos os tubos, porções das colônias foram repicadas no fundo e estrias na rampa, seguindo por incubação a 35 ± 2 °C por 24 horas. Os isolados de colônias típicas, apresentavam características de cor vermelha e centros pretos no XLD, verdes de centros pretos para o HE e preto com tom metálico no BS. Assim, as mesmas foram retiradas com um auxílio de agulha de inoculação e inoculadas em meio com picada.

A partir do TSI, a presença de colônias típicas do gênero *Salmonella* foram caracterizadas pela cor púrpura na parte superior (reação alcalina), amarelo (reação ácida) na parte inferior e com produção de gás H₂S. Enquanto para o LIA, os tubos foram avaliados como positivos se caso houvesse reação alcalina completa do meio e produção de gás H₂S.

4.5 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Através da confirmação de *Salmonella* spp., a mesma foi submetida ao teste de sensibilidade a antimicrobianos *in vitro* pelo método de disco-difusão. Os agentes antimicrobianos utilizados seguiram os antibióticos descritos pelo Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais (CSLI, 2018).

Foi utilizado uma placa de Petri previamente esterilizada e acrescentado meio MH, até ser fundido a placa. Em seguida, foi realizado uma suspensão bacteriana, de forma não padronizada, a partir de de uma amostra contendo uma cultura pura de *Salmonella* spp. em meio PCA, isolada do recheio de uma amostra de sanduíche natural artesanal.

Para a suspensão, foram escolhidas as colônias de maior semelhança morfológica e o inóculo foi repassado, por uma alçada, para um tubo de ensaio com água destilada autoclavada. Após realizada a transferência, agitou-se a alça de platina a fim de garantir a homogeneização do inóculo ao solvente até atingir uma coloração turva. Com auxílio de um *swab*, foi transferido o inóculo do tubo de suspensão bacteriana para a placa de Petri contendo meio MH. Foram feitos posteriormente movimentos semelhantes a estrias de esgotamento em sentidos verticais e horizontais na superfície do meio. Os agentes antimicrobianos contendo ampicilina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg, sulfametoxazol/trimetoprima 25 µg e cloranfenicol 30 µg, foram distribuídos pela placa de Petri. Esperando-se 15 minutos e depois as placas foram incubadas invertidas a 35 ± 1 °C por 20 horas.

A leitura das placas consistiu em mensurar o comprimento da zona de inibição do crescimento bacteriano, formado ao redor de cada disco de antibiótico. Assim, a interpretação foi feita em consideração a concentração de droga que define sensibilidade ou resistência microbiana, do ponto de vista clínico (CSLI, 2018).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos três produtos artesanais coletados (P-1, P-2 e P-3), um era comercializado no local de produção (P-1) e os demais (P-2 e P-3) eram produzidos e comercializados em locais diferentes. Quanto ao tipo de embalagem, somente o produto P-1 era embalado exclusivamente em filme plástico, enquanto os outros dois, além de filme plástico, estavam dispostos em bandejas. Quanto ao prazo de validade, somente os produtos, produtos P-2 e P-3 forneceram essa informação em seus rótulos (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição dos produtos artesanais, com principais ingredientes no recheio e respectivos prazos de validade

| Produtos | Ingredientes no recheio | Prazo de validade |
|-----------------|---|--------------------------|
| P-1 | Frango, cenoura, uvas-passas e maionese | Não informado |
| P-2 | Frango, cenoura, maionese e ricota | 7 dias |
| P-3 | Frango, cenoura e requeijão | 3 dias |

5.1 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DOS SANDUICHES NATURAIS ARTESANAIS

Os resultados da contagem padrão em placa realizada em amostras de sanduíches naturais artesanais (A-1, A-2 e A-3) de três diferentes produtores (P-1, P-2 e P-3) estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Contagens de bactérias mesófilas em sanduíches naturais artesanais, com valores expressos em unidade formadora de colônia (UFC/g)

| Amostras | Produtos | | |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | P-1 | P-2 | P-3 |
| A-1 | $1,4 \times 10^5$ | $2,5 \times 10^7$ | $8,6 \times 10^4$ |
| A-2 | $2,5 \times 10^8$ | $1,6 \times 10^5$ | $4,2 \times 10^4$ |
| A-3 | $7,2 \times 10^3$ | $2,5 \times 10^7$ | $3,6 \times 10^5$ |

As contagens em todas as amostras variaram de $7,2 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^8$ UFC/g, tendo o produto P-3 apresentado a menor variação entre repetições (menos de um ciclo logarítmico), o que demonstra maior uniformidade na produção, enquanto o produto P-1 apresentou variações de até cinco ciclos logarítmicos. Outro fator positivo no produto P-

3 foi o valor máximo alcançado de $3,6 \times 10^5$ UFC/g nas contagens, sendo nos outros dois produtos registrados valores acima de 10^7 UFC/g.

Considerando que não há na legislação brasileira limite estabelecido para essa análise, os produtos não podem ser considerados impróprios ao consumo com base nesses resultados, entretanto, números elevados de bactérias contaminantes nesses alimentos irão contribuir para a redução de sua vida útil, o que acarreta em prejuízos para o produtor.

Quanto aos relatos da literatura sobre a avaliação de bactérias mesófilas em sanduíches naturais, Santana, Vieira e Pinto (2015) verificaram a ocorrência desses microrganismos em sanduíches comercializados em estabelecimentos com serviço *delivery* e os valores encontrados variaram de 10^3 a $6,4 \times 10^6$ UFC/g, enquanto Buyuyoruk et al. (2014) relataram em sanduíches comercializados por vendedores ambulantes, na

Turquia, valores entre 10^3 e 10^7 UFC/g. Em outro estudo, Leite (2016) observou contagens de bactérias mesófilas de $6,5 \times 10^5$ UFC/g em todas as amostras de sanduíches coletadas em empresas de *fast food*. Esses resultados reforçam a necessidade de monitoramento da qualidade microbiológica de sanduíches naturais, tendo sido demonstrada com frequência a ocorrência de amostras com elevadas contagens de bactérias mesófilas totais.

Na avaliação de coliformes totais, todos os produtos apresentaram contagens acima de 10^3 NMP/g, exceto para uma amostra do produto P-3, que obteve $2,4 \times 10^2$ NMP/g (Tabela 3).

Tabela 3 - Padrões microbiológicos de coliformes totais em sanduíches naturais artesanais, com valores expressos em número mais provável por grama (NMP/g).

| Amostras | Produtos | | |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | P-1 | P-2 | P-3 |
| A-1 | $>1,1 \times 10^3$ | $>1,1 \times 10^3$ | $>1,1 \times 10^3$ |
| A-2 | $>1,1 \times 10^3$ | $>1,1 \times 10^3$ | $2,4 \times 10^2$ |
| A-3 | $1,1 \times 10^3$ | $>1,1 \times 10^3$ | $>1,1 \times 10^3$ |

Apesar da contagem de coliformes totais não ser prevista na legislação como requisito microbiológico, sua ocorrência em números elevados contribui para a redução da vida útil dos produtos, além de indicar problemas na qualidade bacteriológica da água.

A ocorrência de coliformes em sanduíches naturais também foi relatada por outros autores. Martins, Viana e Costa (2016) encontraram números acima de 10^2 NMP/g em

sanduíches naturais comercializados em cantinas de uma universidade de Presidente Prudente – SP. Santana, Vieira & Pinto (2015), ao avaliarem sanduíches obtidos de serviços *delivery* na cidade de Ouro Preto – MG encontraram contagens de coliformes variando de 5×10 e $3,7 \times 10^3$ UFC/g, enquanto Buyuyoruk et al. (2014) relataram valores entre 10 e $1,1 \times 10^3$ UFC/g em sanduíches comercializados por vendedores ambulantes na Turquia.

Em outro estudo, os coliformes totais foram identificados quanto ao gênero, sendo encontrados como predominantes em diferentes tipos de sanduíches as bactérias *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, em números variando entre 1-119 UFC/g (ALVES et al., 2016). Ainda, Almeida e Alves (2015) avaliaram a incidência de *Klebsiella* spp. em sanduíches naturais comercializados em diferentes pontos de venda, tendo obtido 70% das amostras contaminadas por esse gênero de coliforme.

Com relação a presença de coliformes termotolerantes, os três produtos avaliados nessa pesquisa apresentaram pelo menos uma amostra com contagem acima do limite máximo exigido (10^2 NMP/g) na RDC nº 12/01 da ANVISA (Tabela 4). Portanto, nenhum dos produtos analisados nessa pesquisa estariam aptos ao consumo, com base nesse requisito microbiológico.

Tabela 4 - Padrões microbiológicos de coliformes termotolerantes em sanduíches naturais artesanais, com valores expressos em número mais provável por grama (NMP/g).

| Amostras | Produtos | | |
|----------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | P-1 | P-2 | P-3 |
| A-1 | $>1,1 \times 10^3$ | <3 | $1,1 \times 10^3$ |
| A-2 | $>1,1 \times 10^3$ | $>1,1 \times 10^3$ | 9,2 |
| A-3 | <3 | 43 | 35 |

Em outras pesquisas sobre qualidade microbiológica de sanduíches naturais, os coliformes termotolerantes foram encontrados com frequência e em números acima do limite da legislação. A contaminação por esses microrganismos foi descrita por El-Shenawy (2016) ao avaliar setenta sanduíches comercializados na região metropolitana do Cairo – Egito, com todas as amostras apresentando contagens acima de 10^3 NMP/g. Martins, Viana & Costa (2016) verificaram que cinco dos sete tipos de sanduíches naturais analisados estavam contaminados com coliformes termotolerantes, tendo pelo menos uma das três amostras analisadas por produto apresentado contagens acima do

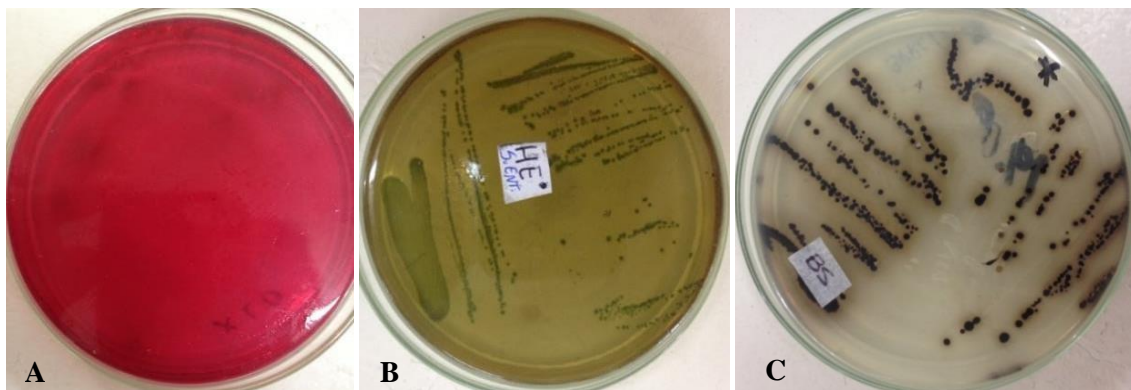
tolerável. Souza, Santos & Santos (2017) também encontraram coliformes termotolerantes em todos os seis tipos de sanduiches naturais pesquisados, tendo pelo menos duas das cinco amostras analisadas por produto apresentado contagens acima do limite estabelecido.

Esses resultados demonstraram a necessidade de maior controle dos alimentos por parte dos órgãos fiscalizadores de suas regiões, de modo a evitar que produtos em condições microbiológicas insatisfatórias sejam comercializados. Ainda evidenciam a deficiência do controle de qualidade na produção ou mesmo a inexistência deste, sendo também responsabilidade da fiscalização exigir as boas práticas na manipulação de alimentos contidas na RDC nº 216/04 da ANVISA (BRASIL, 2004).

Ocorrência de coliformes termotolerantes em alimentos representa um risco a saúde do consumidor, por si só ou porque sua presença pode estar associada com outras enterobactérias, como *Salmonella* spp (ALMEIDA; ALVES, 2015; SOUZA; SANTOS; SANTOS, 2017).

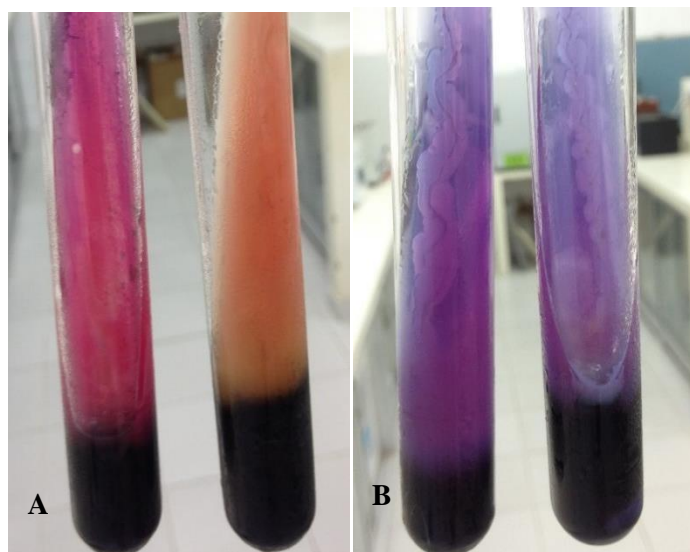
Durante foi a detecção de *Salmonella* spp., foi observada colônias típicas nos meios XLD, HE e BS (Figura 11). Prosseguindo com a confirmação obtida nos meios Ágar TSI e LIA (Figura 12).

Figura 11. Colônias típicas de *Salmonella* spp. nos meios XLD, HE e BS.



(A) meio XLD positivo; (B) meio HE positivo; (C) meio BS positivo. Fonte: Autor, 2018.

Figura 12. Colônias típicas de *Salmonella* spp. em meio Ágar TSI e LIA.



(A) TSI e (B) LIA. Fonte: Autor, 2018.

A presença de *Salmonella* sp. foi observada somente em uma das amostras de sanduíches do produto P-3 (Tabela 5).

Tabela 5 - Detecção de *Salmonella* spp.

| Amostras | Produtos | | |
|----------|----------|---------|----------|
| | P-1 | P-2 | P-3 |
| A-1 | Ausente | Ausente | Presente |
| A-2 | Ausente | Ausente | Ausente |
| A-3 | Ausente | Ausente | Ausente |

Em outros estudos, também foi relatada a presença de *Salmonella* spp. em sanduíches prontos para consumo humano. El-Shenawy (2016) relatou a presença desse patógeno em, no mínimo, três das dez amostras coletadas em diferentes lanchonetes no Cairo – Egito. Almeida e Alves (2015) confirmaram a presença de *Salmonella* spp. em três das dez amostras coletadas em diferentes pontos de venda em Brasília – DF. Fonseca & Pereira (2013), Martins, Viana e Costa (2016) e Souza, Santos e Santos (2017) também confirmaram contaminação por *Salmonella* spp. entre seus sanduíches.

A ocorrência de *Salmonella* spp. em sanduíches naturais pode ser devido ao uso de ingredientes contaminados e de água não potável ou adoção de práticas de manipulação inadequadas (ALMEIDA; ALVES, 2015). Dentre os ingredientes, destacam-se a carne de frango e a maionese, tendo em vista que carnes de aves e ovos são considerados

importantes reservatórios desse patógeno (HEREDIA; GARCIA, 2018). Entretanto, não podem ser desconsideradas outras fontes de contaminação, especialmente os manipuladores de alimentos (ARAUJO et al., 2018).

Com base nos resultados da avaliação microbiológica de sanduiches naturais artesanais comercializados na Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, foi possível verificar que nenhum dos produtos analisados atenderam as exigências da legislação quanto ao limite para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* spp., estando esses, portanto, impróprios ao consumo.

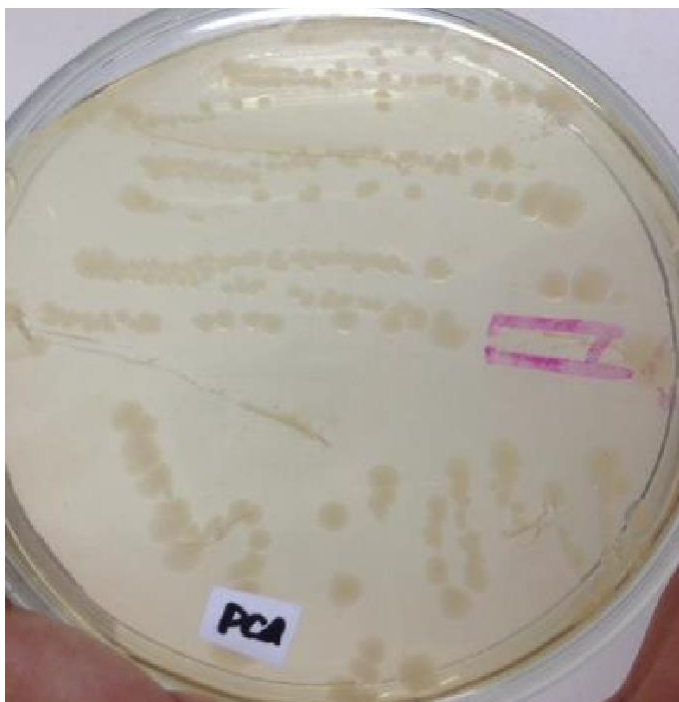
Outra importante observação foi a ocorrência de números elevados de coliformes totais e bactérias mesófilas nesses produtos, indicando deficiência no controle de qualidade dos ingredientes e/ou do processo de produção.

Por serem de fácil preparo, os sanduiches naturais têm sido produzidos em lanchonetes, supermercados, padarias ou mesmo a nível doméstico para serem comercializados em estabelecimentos comerciais ou nas ruas, por vendedores ambulantes. Essa forma de produção e comercialização dificulta a ação dos órgãos fiscalizadores, que precisam estabelecer estratégias e intensificar suas ações de modo a assegurar o consumo de produtos com qualidade microbiológica satisfatória.

5.2 TESTE DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A estirpe de *Salmonella* sp. obtida de uma amostra do produto P-3 foi isolada e posteriormente, submetida ao teste de sensibilidade a antimicrobianos (Figura 13). Os resultados mostraram que a cepa desse patógeno apresentou sensibilidade *in vitro* aos antibióticos usados comumente em prática clínica (Tabela 6).

Figura 13. Estirpe de *Salmonella* sp. em meio PCA.



Fonte: Autor, 2018.

Tabela 6 - Sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos testados, com halos de inibição de crescimento em milímetros (mm).

| Antimicrobianos testados | Halo de inibição de crescimento (mm) | Sensibilidade <i>in vitro</i> |
|-----------------------------|---|----------------------------------|
| Ampicilina | ≥16 | Sensível |
| Ciprofloxacina | ≥21 | Sensível |
| Sulfametoxazol/Trimetoprima | ≥16 | Sensível |
| Cloranfenicol | ≥18 | Sensível |

Acredita-se que a sensibilidade da *Salmonella* spp. foi disseminada devido à falta de pressão seletiva do meio e alta competitividade entre outros microrganismos, como bactérias mesófilas, coliformes totais e termotolerantes em alimentos. Não foram achados na literatura trabalhos de pesquisa publicados nos últimos cinco anos que corroborem com nossos resultados sobre sensibilidade em cepas de *Salmonella* spp. isoladas a partir de sanduíches.

Em outros alimentos, Tunon et al. (2008) observou que cepas de *Salmonella* spp. apresentaram sensibilidade a cloranfenicol e Mendonça (2016) analisou a sensibilidade dos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* a ciprofloxacina, ambos a partir de carnes

de frangos resfriadas e comercializadas por supermercados. Ribeiro et al. (2008) observaram sensibilidade de *S. Enteritidis* a ampicilina, ciprofloxacina e cloranfenicol, em amostras clínicas de frangos para corte e seus ambientes de abatedouro. Silva, Tejada e Timm (2014) demonstraram a resistência de *Salmonella* spp. por ampicilina e cloranfenicol, isolados de fezes de frango e humanos. Segundo Alós (2015), a resistência de antibióticos por *S. enterica* é associada a perda da competitividade no meio e na ausência da pressão seletiva, e podendo adquirir mutações que permitam reverter a resistência para sensibilidade a antibióticos.

6 CONCLUSÕES

Os três tipos de sanduíches naturais artesanais obtidos em lanchonetes da Universidade Federal da Paraíba apresentaram amostras com coliformes termotolerantes, em números que excediam aos padrões microbiológicos da legislação brasileira, estando todos em condições insatisfatórias para consumo humano. Em um dos produtos (P-3), além de problemas com coliformes termotolerantes, foi detectada a presença de *Salmonella* sp. em uma das três amostras analisadas, razão suficiente para reprovar o produto com base nesse requisito. Além das inadequações apresentadas, a maioria das amostras estavam contaminadas com bactérias mesófilas e coliformes totais em números elevados, demonstrando deficiências no processo de produção.

Acredita-se que os produtores e comercializadores dos sanduíches naturais artesanais devem dar maior atenção ao controle de qualidade, melhorando as condições higiênico-sanitárias do processo a fim de evitar possíveis riscos de contaminação do produto. Além disso, é preciso aumentar os esforços por parte dos órgãos fiscalizadores na vigilância sanitária e exigir que padrões microbiológicos sejam respeitados e limites toleráveis da carga microbiana para coliformes e bactérias totais possam ser definidos em alimentos como sanduíches frios.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, B. S.; ALVES, V. J. Perfil microbiológico de sanduíches naturais comercializados na cidade de Juazeiro do Norte-CE. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, 3, 1-8, 2015.
- ALÓS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 33(10), 692-699, 2015.
- ALVES, D. S.; SILVA, N. A. P.; BUENO, R. S. R.; MACHADO, D. S. C.; MARINHO, O. G. L.; CÓRDOBA, G. M. C.; NOBRE, J. A. S. Comparação da qualidade microbiológica de sanduíches comercializados em estabelecimentos do tipo *fast food* franquizados e não franquizados. **Higiene Alimentar**, 30, 260-261, 2016.
- ARAÚJO, P. D.; SISTI, E.; MANSKE, M. L. D. D. L.; BASTOS, B.; SILVA, D. M. D.; RICHTER, C. R. P. Condições microbiológicas de cozinhas e manipuladores de merenda escolar em município do sul do Brasil. **Cadernos da Escola de Saúde**, 17(2), 79-90, 2018.
- BAYLIS, C.; UYTENDAELE, M.; JOOSTEN, H.; DAVIES, A. **The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry**. ILSI, 2011.
- BEZERRA, I. N.; MOREIRA, M. V. T.; CAVALCANTE, J. B.; SOUZA, A. M.; SICHIERI, R. Consumo de alimentos fora do lar no Brasil segundo locais de aquisição. **Revista de Saúde Pública**, 51(15), 1-8, 2017.
- BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução da diretoria colegiada – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acessado em: 24 set 2018.
- _____. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de diretoria colegiada – RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_275_2002_COMP.pdf/fce9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254>. Acessado em: 24 set 2018.
- _____. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de diretoria colegiada – RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Cartilha+Boas+Pr%C3%A1ticas+para+Servi%C3%A7os+de+Alimenta%C3%A7%C3%A3o/d8671f20-2dfc-4071-b516-d59598701af0>>. Acessado em: 28 set 2018.
- _____. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de diretoria colegiada – RDC nº 272, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Cartilha+Boas+Pr%C3%A1ticas+>

para+Servi%C3%A7os+de+Alimenta%C3%A7%C3%A3o/d8671f20-2dfc-4071-b516-d59598701af0>. Acessado em: 30 set 2018.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Instituto Adolfo Lutz – Brasília, 2011.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Surtos de doenças transmitidas no Brasil. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acessado em: 30 set 2018.

BUSH, L. M.; PEREZ, M. T. Manual MSD. Visão geral das infecções por *Salmonella*. Disponível em < <https://www.msdmanuals.com/pt-br/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bacilos-gram-negativos/vis%C3%A3o-geral-das-infec%C3%A7%C3%B5es-por-salmonella>>. Acessado em 15 out 2018.

BÜYÜKYÖRÜK, S.; BEYAZ, D.; GÖKSOY, E.O.; KÖK, F.; KOÇAK, P. Microbiological evaluation of ready-to-eat sandwiches served near hospitals and schools. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 61(3), 193-198, 2014.

CANGUSSU, L. *Salmonella* spp. Disponível em: <<https://www.luciacangussu.bio.br/atlas/salmonella-spp/>>. Acessado em 15 out 2018. CARVALHO, I. T. Microbiologia de alimentos. Recife: EDUFRPE, 2010.

CHLEBICZ, A.; ŚLIŻEWSKA, K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as zoonotic foodborne diseases: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 15(5), 1-28, 2018.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 28th ed. USA, 2018.

COSTA, A. L. P.; SILVA-JUNIOR, A. C. S. **Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura**. Estação Científica: UNIFAP, 7 (2), 45-57, 2017.

EL-SHENAWY, M. A. Fecal pollution and *Salmonella* spp. in sandwiches of meat products vended in Great-Cairo. **Journal of Food and Dairy Technology**, 4(4), 23-26, 2016.

BAM. BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (BAM). Disponível em: < <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm> >. Acessado em 15 agos 2018.

FISCHER, J. (2010). Hidrólise de Lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

FONSECA, J. G.; PEREIRA, M. G. Contaminação microbiana de sanduíches em lanchonetes: estudo transversal realizado em Brasília. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 22(3), 509-516, 2013.

GARCIA, D.; DUARTE, D. Perfil epidemiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, 1(6), 545-554, 2014.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; DESVAUX, M.; HÉBRAUD, M.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; DOULGERAKI, A.; NYCHAS, G. J.; KACÁNIOVÁ, M.; CZACZYK, K.; ÖLMEZ, H.; SIMÕES, M. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, 6(6), 1-26, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 33(3), 667-679, 2010.

HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: a review. **Animal Nutrition**, 4(3), 250-255, 2018.

LEITE, F. A. **Alimentos comercializados na forma de delivery Em Brasília – DF**. UNICEUB, Brasília. 2016.

LIMA, A. A.; MIRANDA, B. S. **Estudo da viabilidade econômica financeira de uma indústria de produção de sanduíches naturais – SANDULIGHT S/A**. UFPA, Belém. 2007.

MACEDO, V. F.; ZANARDO, J. G.; LOPES, R. P. C.; MENDONÇA, H. F. M. S.; RAYMUNDO, N. L. S.; MORAES, R. Prevalência de coliformes e staphylococcus aureus em mãos de manipuladores de alimentos de feira livre de Vitória, ES. **Salus J Health Sci**, 2(2), 27-38, 2016.

MARIANA DANTAS DE CARVALHO VILAR. **Comercialização de alimentos em food trucks em Natal-RN: um olhar sobre a qualidade**. UFRN, Natal. 2017.

MARTINS, T. R.; VIANA, A.; COSTA, J. E. Avaliação Microbiológica De Lanches Naturais Comercializados Em Cantinas De Uma Universidade Do Município De Presidente Prudente – SP. **Colloquium Vitae**, 8, 212-219, 2016.

MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

OLIVEIRA, A. P.; SOLA, M. C.; FEISTEL, J. C.; MOREIRA, N. M.; OLIVEIRA, J. J. *Salmonella* Enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera**, 9(16), 1947-1972, 2013.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 69(3), 277-284, 2010.

QUEIROZ, P. W. V.; COELHO, A. B. Alimentação fora de casa: uma investigação sobre os determinantes da decisão de consumo dos domicílios brasileiros. **Revista Análise Econômica**, 35(67), 67-104, 2017.

REIS, K. T. M. G.; SOUZA, C. H. B.; SANTANA, E. H. W.; ROING, S.M. Qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: revisão. **Ciência e Biologia da Saúde**, 15, 411-422, 2013.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 60(5), 1259-1262, 2008.

SANTANA, F. A.; VIEIRA, M. C.; PINTO, U. M. Qualidade microbiológica de sanduíches estabelecimentos com serviço tipo delivery. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 74(2), 156-161, 2015.

SANTOS-NETO, J. P. **Ocorrência de aeróbios mesófilos, coliformes e *Salmonella* sp., em ovos comerciais higienizados por diferentes métodos**. IFTM, Uberaba, MG. 2016.

SILVA, C. J.; TEJADA, T. S.; TIMM, C. D. Resistência de *Salmonella* isoladas de humanos e de frangos a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 8(4), 120-131, 2014.

SILVA, J. C. G.; SILVA-FILHO, M. M.; NASCIMENTO, V. G.; PEREIRA, D. A. B.; COSTA-JUNIOR, C. E. O. Incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado de Pernambuco, um acompanhamento dos dados epidemiológicos nos últimos anos. **Ciências Biológicas e de Saúde Unit**, 3(1), 23-34, 2017.

SILVA, R. A. **Ciência do alimento: contaminação, manipulação e conservação dos alimentos**. UTFPR. Medianeira. 2012.

SIRTOLI, D. B.; COMARELLA, L. O papel da vigilância sanitária na prevenção das doenças transmitidas por alimentos (DTA). **Revista Saúde e Desenvolvimento**, 12(10), 198-209, 2018.

SOUZA, E. C.; SANTOS, E. M. G.; SANTOS, R. A. R. Avaliação microbiológica de sanduíches naturais comercializados na cidade de Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, 31, 266/267, 2017.

TORTORA, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. **Microbiologia – 12. ed.**, Porto Alegre: Artmed, 2017.

TUNON, G. I. L.; NUNES, R. M.; SILVA, T. M.; CALASANS, M. W. M. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp isolada de carne de frango resfriada comercializada em Aracaju, Sergipe Antimicrobial resistance of *Salmonella* sp isolated from refrigerated

poultry meat sold in Aracaju, Sergipe. **Boletim Epidemiológico Paulista**, 5(52), 4-6, 2008.

UFPB. Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências da Saúde. Disponível em: <<http://www.ccs.ufpb.br/cfisio/contents/imagens/mapa-do-campus-i-ufpb.jpg/view>>. Acessado em 20 out 2018.