

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**CONDIÇÕES HIGIENICOSSANITÁRIAS DA CARNE BOVINA IN
NATURA COMERCIALIZADA NA FEIRA LIVRE DO MUNICÍPIO DE
JIQUIRIÇÁ E O USO DE QUITOSANA COMO ANTIMICROBIANO
NATURAL**

ALESSANDRA SANTANA SILVA

**CRUZ DAS ALMAS - BA
OUTUBRO - 2015**

**CONDIÇÕES HIGIENICOSSANITÁRIAS DA CARNE BOVINA IN
NATURA COMERCIALIZADA NA FEIRA LIVRE DO MUNICÍPIO DE
JIQUIRIÇÁ E O USO DE QUITOSANA COMO ANTIMICROBIANO
NATURAL**

ALESSANDRA SANTANA SILVA

Graduada em Nutrição pela UFRB, 2010.2

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Norma Suely Evangelista-Barreto

Co-orientador: Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza

CRUZ DAS ALMAS - BA

OUTUBRO - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

S586c

Silva, Alessandra Santana.

Condições higienicossanitárias da carne bovina in natura comercializada na Feira Livre do Município de Jiquiriçá e o uso de quitosana como antimicrobiano natural / Alessandra Santana Silva._ Cruz das Almas, BA, 2015.

106f.; il.

Orientadora: Norma Suely Evangelista-Barreto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Carne bovina – Controle de qualidade. 2.Carne bovina – Microbiologia de alimentos. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 664.9

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

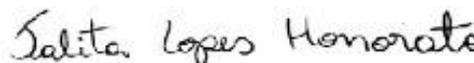
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
ALESSANDRA SANTANA SILVA


Dr.^a Norma Sueely Evangelista-Barreto

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (Orientadora)


Dr.^a Elizabeth Amélia Alves Duarte

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia


Dr.^a Talita Lopes Honorato

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____”.

Dedico

Aos meus avós, saudades eterna...

À minha família, pelo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre comigo, iluminando meus passos.

À minha orientadora Norma Suely Evangelista-Barreto pela oportunidade de realizar este trabalho e por ter me orientado.

Ao meu co-orientador Bartolomeu Warlene Silva de Souza pelo auxílio e disposição.

À professora Elizabeth Amélia Alves Duarte e Professor Thiago Alves Santos de Oliveira pelo apoio e auxílio na análise molecular.

Aos meus pais por tudo...

Aos meus avós, começo da minha história, pelo carinho e amor... Saudades eternas.

Às minhas irmãs e meu irmão pelo carinho, amor, cumplicidade e fraternidade.

Aos meus sobrinhos pelo carinho e amor.

Ao meu namorado pelo amor, carinho e companheirismo.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA, pela amizade e colaboração.

A Marly pela amizade de todas as horas.

Aos colegas e amigos de curso.

Aos meus professores do mestrado e a todos que já me ensinaram, vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e auxílios.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, só tenho a agradecer.

Obrigada!

"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos para sabermos o que seremos."

Autor: Paulo Freire

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aw	Atividade de água
CMH	Complexo Maior de Histocompatibilidade
DVAs	Doenças Veiculadas por Alimentos
CL	Caldo Lactose
LIA	Agar Lisina Ferro
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
RV	Caldo Rappaport
SS	<i>Salmonella Shiguela</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônias por Grama
TSI	Ferro Açúcar Triplo
TT	Caldo Tetrionato
UVM	Caldo Universidade de Vermot
XLD	Xilose-Lisina Desoxicolato

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Mapa de localização do município de Jiquiriçá – Bahia (Fonte: IBGE, 2015) 26

Figura 2 - Estrutura química da quitina e quitosana (ABREU et al., 2013) 33

CAPÍTULO 2: ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E CONDIÇÕES HIGIENICOSSANITÁRIAS DE CARNE BOVINA COMERCIALIZADA NA FEIRA LIVRE DE JIQUIRIÇÁ, BAHIA

Figura1. Percentuais de adequação e inadequação das condições higienicossanitárias da comercialização de carne bovina in natura na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil 58

CAPÍTULO 4: EFEITO ANTIBACTERIANO DE QUITOSANA NO CONTROLE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM CARNE BOVINA

Figura 1. Curvas da análise de regressão das diferentes concentrações de quitosana testada in vitro frente às cepas bacterianas 84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2: ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E CONDIÇÕES HIGIENICOSSANITÁRIAS DE CARNE BOVINA COMERCIALIZADA NA FEIRA LIVRE DE JIQUIRIÇÁ, BAHIA

Tabela 1. Percentuais de conformidade e não conformidade das condições higienicossanitárias dos boxes de comercialização de carne bovina in natura avaliados na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil 58

Tabela 2. Temperatura das amostras de carne bovina in natura comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil 61

Tabela 3. Contagem média de *Staphylococcus* coagulase positiva e presença de *Salmonella* spp. em carne bovina in natura comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil 61

CAPÍTULO 3: IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM CARNE BOVINA UTILIZANDO MÉTODOS CONVENCIONAIS E MOLECULARES

Tabela 1. Número de amostras de carne bovina in natura contaminadas com *Listeria* spp. por boxes de comercialização na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil 73

Tabela 2. Identificação dos isolados de *Listeria monocytogenes* coletados em amostras de carne bovina in natura comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil 73

CAPÍTULO 4: EFEITO ANTIBACTERIANO DE QUITOSANA NO CONTROLE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM CARNE BOVINA

Tabela 1. Redução da carga microbiana média da carne bovina revestida com solução de quitosana a 2% por 72 horas a 4°C 85

ÍNDICE

Resumo

Abstract

Introdução	16
Objetivos	19
Objetivo Geral.....	19
Objetivos Específicos.....	19
Capítulo 1	20
Revisão de Literatura.....	21
Carnes.....	21
Feiras Livres.....	23
Feira Livre do Município de Jiquiriçá - Bahia.....	25
Doenças Veiculadas por Alimentos.....	26
<i>Escherichia coli</i>	28
<i>Listeria monocytogenes</i>	28
<i>Salmonella</i> spp.....	29
<i>Staphylococcus aureus</i>	30
Quitina e Quitosana.....	31
Atividade Antimicrobiana de Quitosana.....	34
Referências.....	36
Capítulo 2	51
Análise Microbiológica e Condições Higienicossanitárias de Carne Bovina Comercializada na Feira Livre de Jiquiriçá, Bahia	
Capítulo 3	70
Identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> em Carne Bovina Utilizando Métodos Convencionais e Moleculares	
Capítulo 4	82
Efeito Antibacteriano de Quitosana no Controle de Bactérias Patogênicas em	

Carne Bovina

Considerações Finais..... 95

Apêndices..... 97

RESUMO

SILVA, A. S. CONDIÇÕES HIGIENICOSSANITÁRIAS DA CARNE BOVINA IN NATURA COMERCIALIZADA NA FEIRA LIVRE DO MUNICÍPIO DE JQUIRIÇÁ E O USO DE QUITOSANA COMO ANTIMICROBIANO NATURAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as condições sanitárias da carne bovina in natura comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá – Bahia, e testar o efeito da quitosana como antimicrobiano natural para o controle microbiológico do alimento. Para tanto, 10 boxes de vendas de carne foram selecionados, nos quais se avaliou os aspectos higienicossanitários e a qualidade microbiológica de 30 amostras de carne bovina in natura. Também foi verificado o efeito antimicrobiano do polímero de quitosana in vitro e adicionado em bifes de carne bovina. Em todos os pontos de venda, as carnes se encontravam expostas em temperatura ambiente, sendo que 78,9% dos itens referentes à comercialização e exposição das carnes, estavam em desacordo com a RDC n° 275 de 21 de outubro de 2002 e RDC n°216, de 15 de setembro de 2004, da ANVISA. Todas as amostras apresentaram contaminação por estafilococos coagulase positiva, com contagens de 3,8 a 6,1 log UFC/g. *Salmonella* spp. foi isolada em 30% das amostras estudadas e *Listeria monocytogenes* em 26,66%. A avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de filmes de quitosana nas concentrações de 1%, 1,5% e 2%, mostrou que a concentração de 2% de quitosana apresentou maior capacidade inibitória, frente às cepas bacterianas testadas (*Escherichia coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*). Os bifes de carne bovina tratados com solução de quitosana a 2% apresentaram redução da carga microbiana de 6 log UFC/g para todas as bactérias patogênicas testadas quando comparadas com as amostras controles. A carne bovina comercializada na feira livre de Jiquiriçá – Bahia apresenta baixa qualidade microbiológica devido às más condições higienicossanitárias em que é comercializada, podendo constituir um risco à

saúde dos consumidores. Entretanto, o uso de revestimento com quitosana pode ser uma alternativa para minimizar a proliferação microbológica devido a sua eficiência como antimicrobiano natural.

Palavras-chave: segurança alimentar, qualidade microbológica, atividade antibacteriana.

ABSTRACT

SILVA, A. S. CONDITIONS OF MEAT IN NATURA SANITARY CONDITIONS BEEF SOLD AT THE FAIR FREE OF JIQUIRIÇÁ COUNTY AND HOW TO USE NATURAL ANTIMICROBIAL CHITOSAN

This study aimed to evaluate the sanitary conditions of fresh beef sold in the open market in the city of Jiquiriçá - Bahia, and test the effect of chitosan as a natural antimicrobial for microbiological control of food. Therefore, 10 boxes of meat sales were selected, in which it evaluated the hygienic toilets aspects and the microbiological quality of 30 samples of fresh beef. It was also verified the antimicrobial effect in vitro chitosan polymer and added to the beef steaks. In all points of sale, the meats were exposed at room temperature, and 78.9% of the items referring to the sale and display of meat, were at odds with the RDC n. 275 of October 21, 2002 and RDC ° 216 of 15 September 2004, ANVISA. All samples were contaminated by coagulase-positive staphylococci, with scores from 3.8 to 6.1 log CFU / g. *Salmonella* spp. It was isolated in 30% of analyzed and *Listeria monocytogenes* 26.66% samples. The evaluation of the in vitro antimicrobial activity of chitosan films at concentrations of 1%, 1.5% and 2%, showed that the concentration of 2% chitosan showed a higher inhibitory capacity, compared to the tested bacterial strains (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*). The beef steaks treated with chitosan 2% solution showed a reduction of the microbial load of 6 log CFU / g for all the tested pathogenic bacteria compared with the control samples. Beef sold in the open market of Jiquiriçá - Bahia has low microbiological quality due to bad hygienic toilets conditions where it is available, may pose a risk to consumer health. However, the use of chitosan coating can be an alternative to minimize microbial proliferation due to its efficiency as natural antimicrobial.

Keywords: food safety, microbiological quality, antibacterial activity.

INTRODUÇÃO

O acesso ao alimento seguro e de qualidade é um direito de todos os brasileiros e tem sido amplamente discutido nos últimos tempos, especialmente, quanto ao aspecto nutricional e à inocuidade dos alimentos (CARDOSO; SOUZA; SANTOS, 2005; COSTA, 2014). Nesse sentido, os alimentos comercializados devem ser seguros, ou seja, não devem apresentar contaminação, quer seja de natureza química, física ou biológica. Os perigos físicos são os mais comumente identificados pelos consumidores, enquanto os perigos químicos e microbiológicos se destacam em um risco maior do ponto de vista da saúde pública, por serem de difícil identificação (RIBEIRO; FRAVET, 2010).

No Brasil, um dos grandes problemas é a comercialização de carne em feiras livres uma vez que estas, geralmente, não possuem infraestrutura adequada para comercialização de alimentos e apresentam condições higienicossanitárias precárias (ALMEIDA et al., 2011), favorecendo a contaminação microbiológica da carne (RAPOSO; ARAÚJO; FURTUNATO, 2008). Os produtos a base de carne apresentam maior contaminação por microrganismos potencialmente patogênicos quando comparados com outros alimentos (SILVA et al., 2010). Este fator faz com que os produtos cárneos sejam um dos gêneros alimentícios mais envolvidos em surtos alimentares (EDUARDO; KATSUYA; BASSIT, 2008).

As bactérias patogênicas mais comuns em carne bovina são *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. (SILVA; BERGAMINI; OLIVEIRA, 2010) e *Listeria monocytogenes* (MANTILLA et al., 2007). Dentre essas, destaca-se *E. coli* que compreende um grupo de bactérias em constante mutação apresentando tanto cepas patogênicas quanto comensais (WILLIAMS et al., 2010), *L. monocytogenes* por ser resistente a grandes variações de pH, temperatura e concentrações salinas (GANDHI et al., 2007; ZHU et al., 2012), *S. aureus* que faz parte da microbiota normal da pele e mucosa de mamíferos e aves (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012) e se destaca por ser responsável por surtos de intoxicação alimentar decorrentes da formação de toxinas estafilocócicas no alimento (ROCHA et al., 2013) e o patógeno *Salmonella*

spp., por ser comumente encontrado no trato gastrointestinal de animais de produção, o que torna os alimentos de origem animal os maiores responsáveis pela veiculação dessa bactéria (GREIG; RAVEL, 2009).

O processo de mudanças nos padrões nutricionais e os benefícios creditados a uma alimentação saudável dinamizaram intensamente todos os setores responsáveis pela produção de alimentos, bem como, a busca por alternativas de conservação desses produtos. Esse processo de mudança e a crescente exigência do consumidor por alimentos mais seguros têm impulsionado cada vez mais, a pesquisa por conservantes naturais e incentivado as indústrias de alimentos a implantarem políticas que minimizem o uso de aditivos químicos (FAI, 2000).

Os sulfitos há muito tempo são largamente utilizados em produtos cárneos, entretanto, além de ser considerado um produto carcinogênico e mutagênico, a exposição a este agente causa problemas respiratórios em indivíduos sensíveis a esse composto (FENNEMA, 1993; NITRINI et al., 2000). Nos Estados Unidos, o uso de agentes sulfitantes em alimentos não é permitido (ROLLER et al., 2002), porém no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) proíbe a utilização desses agentes apenas em frutas frescas, vegetais e alimentos fontes de tiamina (BRASIL, 1999).

Tendo em vista o emprego indiscriminado dos aditivos artificiais e considerando os riscos impostos pelos microrganismos patogênicos em produtos cárneos, faz-se necessário a realização de pesquisas que avalie a ação antimicrobiana de produtos naturais eficientes para a conservação de carnes sem causar danos à saúde do consumidor. Nesse sentido, o uso de quitosana no controle microbiológico tem sido estudado, por este polissacarídeo apresentar atividade antimicrobiana *in vitro* contra uma variedade de microrganismos de origem alimentar (ROLLER et al., 2002; PAIVA; NETO; BATISTA, 2014) e baixa toxicidade (BARRETEAU; DELATTRE; MICHUD, 2006). Esses estudos têm demonstrado que a quitosana apresenta potencial antimicrobiano natural e pode ser utilizada na conservação de alimentos.

A quitosana é um polissacarídeo linear derivado da quitina, presente nos resíduos de crustáceos da indústria pesqueira e na parede celular de diversos fungos (KUNIYOSHI, 2012). Nos últimos anos, a quitosana tem sido utilizada

como revestimento comestível de produtos minimamente processados (SOARES et al, 2011), filés de pescado (FERNÁNDEZ-SAIZ et al., 2013) e no tratamento pós-colheita de frutas (CHONG, LAI; YANG, 2014), hortaliças (SANTOS, 2008) e raízes (BUSO et al., 2014).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar as condições sanitárias da carne bovina in natura comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá – Bahia, e testar o efeito da quitosana como antimicrobiano natural para o controle microbiológico do alimento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as condições higienicossanitárias da carne bovina in natura comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá – Bahia, com aplicação de *check list*.
- Aferir temperatura interna de cortes de carne bovina comercializados na feira livre do município de Jiquiriçá – Bahia.
- Identificar a presença dos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e estafilococos coagulase positiva na carne bovina in natura comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá – Bahia.
- Testar o efeito antimicrobiano da quitosana contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* in vitro e adicionada na carne bovina.

REVISÃO DE LITERATURA

**CONDIÇÕES HIGIENICOSSANITÁRIAS DE CARNE BOVINA IN
NATURA COMERCIALIZADA EM FEIRAS LIVRES E O USO DE
QUITOSANA COMO ANTIMICROBIANO NATURAL**

REVISÃO DE LITERATURA

CARNE

Comercialmente, denominam-se carne todas as partes dos animais que servem de alimento ao homem (PHILIPPI, 2006) e pode ser adquiridas como produtos frescos, congelados, embalados a vácuo, secos, salgados, defumados ou enlatados (SOUSA et al., 2012).

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de carne bovina do mundo (ABIEC, 2011). No entanto, esta posição está ameaçada pelas limitações próprias do setor, como enfermidades que afetam a produtividade e restrições tarifárias impostas pelos grandes mercados mundiais (RUBIN; WAQUIL, 2013). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2013), no segundo trimestre de 2013 o Brasil exportou 274 363 toneladas de carne bovina in natura.

A carne é um dos produtos de origem animal mais consumido como fonte protéica pelos seres humanos (RUBIN; WAQUIL, 2013). É uma importante fonte de proteínas de alto valor biológico, uma vez que, sua composição de aminoácidos atende as necessidades nutricionais humanas em condições fisiológicas normais. Esse gênero alimentício também se destaca por fornecer micronutrientes, sendo uma das principais fontes de ferro, vitaminas do complexo B (principalmente B12) e zinco (MEDEIROS, 2008). O ferro é o mineral mais abundante na carne bovina, seguido pelo potássio, sódio, magnésio e zinco. Todos esses minerais são essenciais ao ser humano (OLIVEIRA; SILVA; CORREIA, 2013). As carnes são constituídas aproximadamente de 75% de água, 19% de proteína, 3,5% de substâncias não-proteicas solúveis e 2,5% de gorduras (LAWRIE, 2005). A elevada atividade de água (aw), o pH e a composição nutricional da carne favorecem o crescimento de bactérias, leveduras e bolores. Isso faz com que a carne seja considerada um alimento altamente perecível (FRANCO; LANDGRAF, 2008; ARAUJO et al., 2012).

A carne em suas diversas preparações tem sido o alimento mais comumente envolvido em surtos com agentes etiológicos de doenças alimentares. No Brasil, de acordo com dados epidemiológicos de 2000 a 2011, dos 1.296 surtos que ocorreram em restaurantes e padarias, a carne bovina foi considerada a classe de alimentos mais associada aos surtos, sendo responsável por 358 dos casos em que o alimento foi identificado (SVS, 2011). Este fato se deve ao consumo elevado do produto, uma vez que, de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008 a 2009, a carne bovina juntamente com o feijão, arroz, sucos, refrigerantes e café, ocuparam as maiores médias de consumo diário de alimentos por pessoa no Brasil. Assim, a venda de carnes frescas ou secas constitui um comércio importante e bastante procurado pela população, mas apresenta condições higienicossanitárias duvidosas. A comercialização do alimento com baixa qualidade microbiológica se deve à falta de conhecimento dos comerciantes e consumidores, além da ausência de fiscalização (GERMANO; GERMANO, 2008).

A contaminação da carne pode decorrer tanto no animal (via endógena) quanto *post mortem* (via exógena) (EVANGELISTA, 2005). A contaminação por via endógena é menos prevalente e advém de doenças estabelecidas no animal vivo, sendo comumente provocadas por bactérias e parasitos, com destaque às salmoneloses, traquinose e teníase (LAWRIE, 2005).

Os principais meios de contaminação da carne, durante o abate e manipulação, são as facas utilizadas para sangria, que não sendo esterilizadas antes de cada abate pode carrear microrganismos contaminantes; a pele do animal que pode ser um contaminante da faca de sangria ou contaminar as carcaças em locais feridos; o trato gastrintestinal e os nódulos linfáticos que possuem uma elevada e variada microbiota e, se perfurados, podem contaminar toda a carcaça; as mãos dos manipuladores que se configuram como uma das mais importantes fontes de contaminação cruzada; os recipientes em que a carne é armazenada, que não sendo esterilizados carreiam microrganismos contaminantes; bem como, o ambiente de manuseio e armazenamento que podem permitir a contaminação da carne (JAY, 2005). Além disso, a inadequação no transporte e suas etapas posteriores tais como o processo de refrigeração, sucessivos processos de congelamento e descongelamento, subdivisão das

peças, exposição ao ar e ao ambiente, condições e técnicas de manipulação, embalagem e armazenamento inadequados, também são considerados importantes fontes de contaminação para a carne (EVANGELISTA, 2005).

O controle higienicossanitário da carne é importante, uma vez que mesmo obtida a partir de animais sadios, a sua qualidade depende não só da microbiota natural, mas de contaminantes patogênicos e deteriorantes, bem como da higiene durante todo o processo produtivo e de beneficiamento, pois a matéria-prima sofre deterioração proteica logo que termina o processo de *rigor mortis* (OLIVEIRA; NASCIMENTO; FIORINI, 2002; PEREIRA et al., 2009).

A microbiota normal de produtos à base de carne bovina é composta, predominantemente, por bactérias Gram-negativas da família Enterobacteriaceae e gênero *Pseudomonas*; e por Gram-positivas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus* (JAY, 2005). Nesse sentido, a resolução RDC nº12/2001 da ANVISA (BRASIL, 2001) estabelece parâmetros aceitáveis para contagens de alguns microrganismos em carnes a fim de garantir a segurança do alimento.

A deterioração da carne pode ser observada por alteração das características organolépticas como cor, odor e o surgimento de limo superficial resultante do crescimento microbiano. Geralmente essas alterações começam a ocorrer quando a população microbiana, em sua superfície, atinge valores de 10^7 a 10^8 UFC/g (DAINTY; MACKEY, 1992).

FEIRAS LIVRES

A feira livre foi criada oficialmente no final de 1904, no Rio de Janeiro e caracteriza-se como uma forma de mercado varejista ao ar livre. Realizada semanalmente, a feira livre é organizada como serviço de utilidade pública dos municípios e está voltada para a comercialização de produtos da região (MASCARENHAS; DOLZANI, 2008). Porém, não se configura apenas como um local de compra e venda, mas também de encontros e lazer, troca de informações, articulações políticas ou diversão (ALMEIDA et al., 2011).

A forma de comércio da feira possibilita aos consumidores comprar produtos com preços variados entre os comerciantes de uma mesma mercadoria, pois possui uma concentração de comerciantes em um único lugar e apresenta livre

concorrência. Isso gera um impacto positivo sobre o preço dos produtos (COUTINHO et al., 2007; LUNDGREN et al., 2009).

No Brasil não existir uma legislação específica para as feiras o que dificulta a compreensão do que é adequado para comercialização de gêneros alimentícios nos estabelecimentos, até mesmo, para os agentes de fiscalização. Uma vez que, baseado nas normas gerais para comercialização de alimentos, os estabelecimentos das feiras livres não possuem as condições básicas para o correto controle higienicossanitário exigido para a venda desses produtos (BEIRÓ; SILVA, 2009), isso torna a fiscalização nas feiras livres ainda mais difícil. Nesse contexto, continua sendo permitida a comercialização de produtos perecíveis nas feiras livres, como a carne in natura que é exposta à venda em condições inadequadas de armazenamento e sem refrigeração. O fato da temperatura ambiente no Brasil ser elevada, sendo este um país tropical, torna a carne bovina comercializada nessas condições, um risco para a saúde do consumidor (BARROS; VIOLANTE, 2014).

Almeida et al. (2011), em um estudo realizado com carnes comercializadas na feira livre de Paranatama, PE, relataram que o alimento era exposto à venda em temperatura ambiente, sobre superfícies de madeira forrada com pedaços de papelão ou lona plástica e/ou penduradas em ganchos de ferro oxidado, favorecendo assim a contaminação do produto.

Um dos problemas para melhoria do controle higienicossanitário dos produtos de origem animal comercializados em feiras livres no Brasil, é a resistência por parte dos feirantes em adequar suas práticas higiênicas, uma vez que, os hábitos de higiene, são herdados e transmitidos por gerações de feirantes. Essas práticas não são mudadas facilmente apenas com a determinação de normas, com a oferta de cursos esporádicos ou a realização de ações coativas de fiscalização e controle. Essas ações têm pouca influência na mudança dos hábitos de higiene dessa categoria. Para eles, a ideia central de contaminação está associada à alteração nas características visíveis do produto e não à presença de um contaminante biológico ou químico. Nesse sentido, a feira é um espaço de significações que necessita ser entendido para que as intervenções sanitárias sejam viáveis. Uma vez que, para muitos vendedores, a limpeza do lugar é utilizada como estratégia de marketing e não como um aspecto

de saúde. Para eles, deve-se manter a limpeza para atrair clientes e não porque a falta de higiene contamina o alimento e provoca doenças (MINNAERT; FREITAS, 2010).

FEIRA LIVRE DO MUNICÍPIO DE JIQUIRIÇÁ - BAHIA

O município de Jiquiriçá – Bahia está localizado a 258 km de Salvador, capital da Bahia, na região do Vale do Jiquiriçá, Bahia, Brasil, que lhe confere um clima tropical. Esse município apresenta uma extensão territorial de 236,741km², estando limitado ao Sul, por Laje, a Oeste, por Mutuípe e Laje, a Leste por Teolândia e ao Norte por Ubaira. A população estimada em 2015 é de 15.033 habitantes e a densidade demográfica é de 58,97 hab/ km². Suas atividades produtivas estão vinculadas à Região Econômica do Recôncavo Sul (IBGE, 2015).



Figura 1- Mapa de localização do município de Jiquiriçá – Bahia (Fonte: IBGE, 2015)

Rico em recursos hídricos, o município de Jiquiriçá possui belas cachoeiras que atraem turistas e nativos que não habitam mais no município. Outro ponto de encontro importante do município é a feira livre municipal que tradicionalmente é conhecida em toda a região e constituiu uma das primeiras atividades comerciais desenvolvidas na cidade. Sua existência remonta à história da origem da própria cidade, quando em seus primórdios localizava-se nos arredores da atual Praça

Dom Florêncio. A feira livre de Jiquiriçá – Bahia é um local público em que muitas pessoas trabalham para sustentar suas famílias através da venda de mercadorias variadas que movimentam a economia local. Além disso, é um atrativo comercial que recebe visitas, principalmente aos sábados, de pessoas residentes na zona rural do município e dos moradores da cede para adquirir produtos de origem animal (carnes, ovos, leite e animais vivos) ou vegetal (frutas, hortaliças, parte de plantas medicinais, mudas de plantas, sementes etc.) cultivados na zona rural do município, ou não. Há também a comercialização de produtos como roupas e utensílios domésticos vendidos por ambulantes que muitas vezes são oriundos de outros municípios.

Segundo informações da Vigilância Sanitária Municipal de Jiquiriçá (2015), a carne bovina in natura comercializada na feira livre do município, atualmente, é oriunda de um abatedouro localizado em um município vizinho. O tipo de carne mais comercializado na feira livre do município de Jiquiriçá – Bahia é a carne bovina, tendo em vista que dos 30 boxes que comercializam carne, 27 são de carne bovina, sendo que 19 boxes comercializam carne bovina in natura, cinco carne de sol e três charque.

DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS

Resultantes da ingestão de água e/ou alimentos contaminados por toxinas, agrotóxicos, bactérias, vírus, príons, produtos químicos e metais pesados (BRASIL, 2005), as doenças veiculadas por alimentos (DVA) constituem um grande problema de saúde pública. Sendo disseminada em diversos países e podendo alcançar um número alarmante de indivíduos (OLIVEIRA et al., 2013). Dentre as DVA, destacam-se as infecções causadas por células vivas de microrganismos patogênicos, após a ingestão de alimentos contaminados por estes; as intoxicações causadas pelo consumo de alimentos contaminados com toxinas de origem bacteriana e/ou fúngica e as toxinfecções causadas pela ingestão de alimentos contaminados com microrganismos que liberam toxinas após infectar o organismo (BARBOSA, 2009).

As DVA podem provocar anorexia, vômito, cefaleia, náuseas e/ou diarreia, que são sinais e sintomas resultantes das alterações do aparelho gastrointestinal.

Essas alterações podem variar de acordo com o organismo ou toxina encontrada, quantidade de alimento ingerido e com o sistema de defesa do indivíduo (FLORES; MELO, 2015). Dessa forma, alguns grupos de pessoas são mais suscetíveis a apresentarem DVA, sendo estes, pertencentes à população de risco como mulheres grávidas, recém-nascidos, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (LITTLE et al., 2010). O envelhecimento das populações está diretamente relacionado com o aumento do número de DVA em diversos países (BRONER et al., 2010). Além disso, a incidência das DVA tem relação com os aspectos políticos, econômicos, sociais, ambientais e culturais dos países atingidos (BRASIL, 2012). Nesse sentido, as mudanças nos hábitos alimentares, aumento no número de refeições coletivas e mudanças nos processos de criação dos animais, são possíveis fatores de risco para o aumento do número de ocorrências de DVA (SILVA et al., 2011). Contudo, problemas na manipulação dos alimentos têm sido identificados como sendo a principal causa envolvida em surtos de DVA (BRONER et al., 2010).

No período de 2000 a 2013, a região Sudeste representou 39,8% dos casos notificados de DVA no Brasil, seguido da região Sul com 38,9% e da região Nordeste com 11,9%. A região Norte apresenta o menor percentual, com apenas 3,5% dos casos notificados no país. A carne bovina é o quinto alimento mais envolvido em surtos alimentares no Brasil, sendo responsável por 345 casos do total de surtos nesse período. Os principais microrganismos envolvidos nesses casos foram *Salmonella* spp., *S. aureus* e *E. coli* (SINAN, 2015).

No Brasil os casos de DVA são subnotificados, dessa forma, faz-se necessária a criação e implantação de medidas eficazes para a notificação fidedigna desses agravos em todas as regiões brasileiras, para que os relatos epidemiológicos se tornem mais confiáveis e favoreça as ações preventivas e de monitoramento. Pois, o impacto causado por estas doenças alcança níveis preocupantes a cada ano acarretando grandes prejuízos à saúde pública, sociedade, indústrias e turismo (OLIVEIRA et al., 2013).

Escherichia coli

O gênero *Escherichia* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é composto pelas espécies *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris*, *E. albertii* e a *E. adecarboxylata* e *E. coli*, sendo esta última a de maior importância prática, englobando grande número de grupos e tipos sorológicos. Estes sorogrupos são definidos através de seus antígenos O, K e H, que nem sempre são apresentados simultaneamente (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Compreende um grupo de bactérias em constante evolução que incluem tanto cepas patogênicas quanto comensais. A diversidade patogênica da *E. coli* resulta da inserção e deleção de genes, que determinam diferentes propriedades de virulência para cada isolado bacteriano (WILLIAMS et al., 2010). *E. coli* é um bastonete curto, Gram-negativo, não esporulado, que usualmente se move por flagelos peritríquios, além de ser anaeróbio facultativo (JAY, 2005).

Escherichia coli pode ser encontrada na água, no solo, em resíduos, ou qualquer outro local contaminado com dejetos humanos ou de outros animais. Por isso, e por ser de fácil isolamento nos meios de cultura convencionais e resistente por um período de tempo maior no ambiente, essa bactéria é utilizada como indicador de contaminação fecal em água e alimentos (SOUSA, 2006).

Considerando que *E. coli* é um microrganismo que habita o trato intestinal de humanos e de animais de sangue quente, a exemplo dos bovinos, os cortes de carne bovina podem ser contaminados com essa bactéria durante o abate, caso não haja um adequado controle sanitário durante esse processo (MOLINA, 2013).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes é um cocobacilo Gram-positivo, catalase positiva, não forma esporos e produz ácido lático a partir de glicose e de outros açúcares. Cresce em baixas concentrações de oxigênio e em altas concentrações de dióxido de carbono e são bactérias anaeróbias facultativas. Consegue se multiplicar em uma faixa de temperatura de 0,4 a 45°C, em pH que varia de 4,1 a 9,6, e em substratos com aw de 0,92 ou mais, podendo crescer em altas concentrações de sal, com salmoura de 10% (JAY, 2005).

Patógeno intracelular facultativo, *L. monocytogenes* pode crescer em macrófagos, células epiteliais e fibroblastos cultivados. Todas as cepas virulentas produzem uma hemolisina, a listeriolisina tipo O, que está geneticamente relacionada com a Estreptomicina tipo O e a Pneumolisina (MURRAY et al., 2000). Os mecanismos pelos quais essa bactéria causa listeriose ainda não estão bem definidos. Sabe-se, entretanto, que ela produz toxinas hemolíticas (hemolisinas) e toxinas lipolíticas, responsáveis pelo aumento na produção de monócitos e pela depressão na atividade de linfócitos (MARTH, 1988).

Em humanos, a listeriose causa septicemias, abortos e danos ao sistema nervoso central, ocasionando meningites (GYLES et al., 2004). Dessa forma, apesar da baixa incidência, a listeriose representa importante risco à saúde pública devido ao elevado grau de severidade das sequelas e o alto risco de mortalidade (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008). O período de incubação pode variar de 20 horas, após a ingestão de alimentos contaminados, a 20–30 dias, nos casos de doenças invasivas (DWIGHT; YUAN, 2009).

Em fevereiro de 2000, sete pessoas, entre elas dois recém-nascidos, foram vítimas de uma epidemia causada por *L. monocytogenes* na França e morreram. Outras 23 ficaram hospitalizadas com os clássicos sintomas: febre alta, cefaleia e problemas intestinais. Indícios apontaram, com base na análise dos resultados, que a epidemia localizada em 19 distritos franceses, teve a sua origem em uma casa de produtos cárneos (COLAÇO, 2008).

Listeria monocytogenes é encontrada na natureza e no trato intestinal dos animais, dessa forma, é comum a contaminação da carcaça e cortes de carne por esse patógeno durante o abate e processamento (MANTILLA, 2007).

***Salmonella* spp.**

Salmonella spp. pertence à família Enterobacteriaceae e são bacilos Gram-negativos não produtores de esporos. Anaeróbios facultativos, produzem gás e ácido a partir da glicose (exceto *Salmonella* Typhi), bem como utilizam citrato como única fonte de carbono (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O gênero é composto por duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*. A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica*

subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (WINN, et al., 2008). Atualmente, existem 2.610 sorotipos descritos, sendo a maioria destes pertencentes à *S. enterica* subsp. *enterica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010). A maior parte desses sorotipos é patogênica ao homem, podendo causar diferentes sintomatologias, a depender do mecanismo de patogenicidade e da resposta do sistema imunológico do indivíduo (FDA, 2015). Dentre os sorotipos de *S. entérica*, destacam-se os mais frequentemente relacionados com infecções em humanos como *S. entérica* sorotipo Enteritidis, *S. entérica* sorotipo Typhimurium, *S. entérica* sorotipo Newport, *S. entérica* sorotipo Heidelberg, *S. entérica* sorotipo Infantis, *S. entérica* sorotipo Virchow, *S. entérica* sorotipo Hadar e *S. entérica* sorotipo Agona, distribuídos em proporções diferentes nas diversas regiões do mundo (JONES et al., 2008).

Os dados epidemiológicos de DVAs, apresentados pelo Ministério da Saúde na última década, mostra que cerca de 40% foram causados por *Salmonella* spp., isso demonstra a importância das boas práticas de manipulação para o controle dessa bactéria nos gêneros alimentícios (BRASIL, 2012). Desta forma, a constante vigilância da presença de *Salmonella* spp. em produtos alimentícios é de grande importância para o fornecimento de alimentos microbiologicamente seguros (PUFFAL, 2013), uma vez que, a incidência e severidade de doenças como a salmonelose tem aumentado significativamente em humanos (LEE et al., 2015).

Staphylococcus spp.

Pertencente à família Staphylococcaceae, o gênero *Staphylococcus* é formado por bactérias Gram-positivos em forma de cocos, são microrganismos anaeróbios facultativos, imóveis que tendem a formar agrupamentos em formato semelhante a cachos de uva, se desenvolvem entre 7°C e 47,8°C e produzem enterotoxinas em temperaturas que variam entre 10°C e 46°C (GERMANO; GERMANO, 2008). Estafilococos coagulase positiva são considerados patogênicos, enquanto *Staphylococcus* coagulase negativa são classificados apenas como contaminantes em alimentos (RALL et al., 2010). *Staphylococcus*

coagulase positiva e catalase positiva coagulam o plasma de diferentes espécies animais e são produtoras de ácido α -toxina (toxina hemolítica). Nos meios seletivos mais usados (*Baird-Parker* agar) formam colônias circulares negras, apresentando a capacidade de hidrolisar a lecitina. Crescem em meios com pH entre 4,5 e 9,3 (pH ideal entre 7,0 e 7,5), com baixos níveis de atividade de água ($a_w = 0,83$) e com elevada pressão osmótica (CFSAN, 2009).

As enterotoxinas produzidas pelo *S. aureus* são consideradas superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções hepáticas e renais (FERNANDEZ et al., 2006).

Staphylococcus coagulase positiva é um dos maiores causadores de intoxicação de origem alimentar, porém pode estar presente como um membro persistente ou temporário na microbiota nasal humana, sem causar nenhum sintoma. Dessa forma, a presença dessa bactéria nos alimentos é frequentemente causada pela manipulação inadequada de alimentos, por pessoas portadoras deste microrganismo (HATAKKA et al., 2000).

A carne bovina pode ser contaminada por esse patógeno durante o abate e manipulação, uma vez que, além de estar presente nas mãos, via oral e nasal de humanas as bactérias do gênero *Staphylococcus* também são encontradas no couro de bovinos (ROSINA; MONEGO, 2013).

QUITINA E QUITOSANA

A quitosana é um polímero linear de D-glicosamina, obtido a partir da desacetilação parcial da quitina (AIROLDI, 2008; BADAWY; RABEA, 2009), enquanto a quitina é um polissacarídeo formado por monômeros de β -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) insolúvel em água e solventes orgânicos (FRANCO et al., 2005; NITSCHKE et al., 2011). Dessa forma, a diferença entre a quitosana e a quitina é a substituição do grupo acetamino na posição 2 da quitina, pelo grupo amino na quitosana (Figura 2) (MOURA et al., 2006; PINTO, 2011).

A quitina é um biopolímero, atóxico, biodegradável, amplamente distribuída na natureza (FRANCO et al., 2005), encontrado principalmente em exoesqueletos de artrópodes (crustáceos e insetos) e na parede celular de alguns fungos. Também está presente nas rádulas dos moluscos e nos cefalópodes como polvos e lulas (KUNIYOSHI, 2012). Compõe de 15-30% do exoesqueleto de caranguejo e no camarão essa composição fica em torno de 30-40% (TASKIN; CANISAG; SEM, 2014).

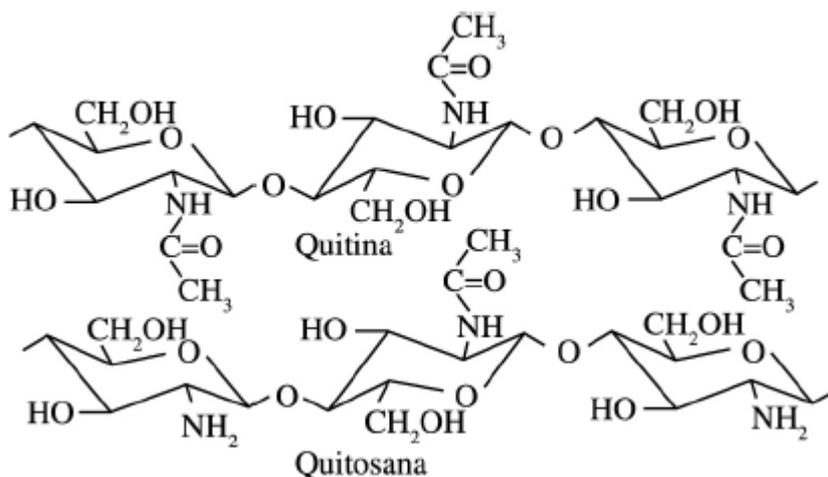


Figura 2 - Estrutura química da quitina e quitosana (ABREU et al., 2013)

Os primeiros relatos do isolamento de quitina datam de 1811, pelo professor francês Henri Braconnot quando trabalhava com fungos, denominando-a inicialmente como fungina (MATSUI, 2007). Em 1859, o professor C. Rouget descobriu que ao se tratar a quitina com solventes alcalinos, obtinha-se um derivado solúvel em meio ácido. Esse derivado foi chamado quitosana por hoppe-Seiler (MUZZARELLI et al., 2012).

Apesar de sua ampla distribuição e disponibilidade na natureza, a quitina é subaproveitada, sendo extraída comercialmente apenas da casca de crustáceos, principalmente de caranguejos, lagostas, camarão e siri (DAMIAN et al., 2005; KUNIYOSHI, 2012). A quitina isolada de carapaças de crustáceos é submetida a etapas de pré-tratamento, desmineralização, desproteinização, desodorização e secagem (MOURA et al., 2006; PINTO, 2011). Após esses processos, a quitina é convertida em quitosana por desacetilação com solução de NaOH concentrada. Isto causa mudanças no peso molecular e no grau de desacetilação (DAMIAN et al., 2005). Na reação de hidrólise são removidos grupos acetila da quitina,

ocorrendo à liberação de grupos amino que ajudam na natureza catiônica da quitosana resultante (OLIVEIRA, 2006).

O grau de desacetilação apresenta-se como uma característica muito importante, rotulando o polímero como quitínico ou quitosânico. Deste modo, à medida que aumenta o grau de desacetilação, aumenta também a solubilidade da quitosana em meio aquoso, atribuindo carga positiva a esse polímero, o que favorece as reações com polímeros aniônicos e em superfícies com carga negativa (TORRES, 2009). A quitosana é solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6,0 (GOOSEN, 1996). Já a quitina apresenta baixa reatividade e é praticamente insolúvel, por isso tem aplicação mais limitada que a quitosana (AZEVEDO et al., 2007; AIROLDI, 2008; KUNIYOSHI, 2012).

O Japão e os Estados Unidos são considerados os principais países produtores e consumidores de quitina e quitosana, entretanto, outros países já mostraram interesse e passaram a desenvolver pesquisas e produzir esses polímeros. No Brasil, apesar do grande potencial hídrico que favorece a indústria de processamento de crustáceos no país, a produção desses polímeros é considerada baixa (ASSIS; DOUGLAS, 2008).

A quitosana por ser um produto natural, de baixo custo, renovável, abundante e atóxico, vem sendo estudada e utilizada em diversas áreas como a área médica (FRÁGUAS, 2015), farmacêutica (SILVA; FIDELES; FOOK, 2015), agrícola (CAMPOS; KWIATKOWSKI; CLEMENTE, 2011), cosmética (KUNIYOSHI, 2012), em tratamentos de água (SANTANA et al., 2013) e na indústria de alimentos (ORGAZ et al., 2013). Além disso, esse polímero é degradado por várias enzimas proteolíticas e por isso apresenta propriedades biológicas como: antioxidante, antimicrobiana, analgésica, inibe a absorção de colesterol e favorece a perda de peso (MARICATO, 2010).

Baldrick (2010) em um estudo sobre o uso de quitosana como excipiente conclui que a administração oral parece segura uma vez que os dados toxicológicos indicam que altas doses são bem toleradas por ratos e coelhos. Em humanos, a ingestão oral através de suplementação dietética não apresentou efeitos adversos. A probabilidade de acúmulo de quitosana no organismo é baixa, pois quando absorvido esse polímero é convertido em derivados de glucosamina

e são naturalmente excretados ou usados como fonte de açúcares e aminoácidos pelo organismo (KEAN; THANOU, 2010).

No Japão a quitosana é um ingrediente comum em alimentos e na Europa é utilizada como anticolesterolêmico, pois pode reduzir os níveis séricos de colesterol em 20 a 30% em humanos (ABRAM; HIGUERA, 2004). No Brasil polímeros de quitosana podem ser adicionados aos alimentos e estes produtos alimentícios podem apresentar propriedade funcional por auxiliar na redução da absorção de gordura e colesterol da dieta (BRASIL, 2008).

Na indústria alimentícia, a quitosana oferece um amplo espectro de aplicações, como a formação de filmes biodegradáveis (SOUSA et al., 2015), recuperação de subprodutos, purificação de água, clarificação de sucos, emulsificante de aromas, agente antioxidante e estabilizante (BORGONGNONI; POLAKIEWICZ; PITOMBO, 2006), além da sua ação antimicrobiana que tem sido testada no controle microbiológico de alimentos (SHEKARFOROUSH et al., 2015; WANG et al., 2015).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE QUITOSANA

Pesquisas inovadoras tem sido desenvolvidas com quitosana a fim de otimizar o seu potencial de aplicação como bioconservador em alimentos, uma vez que esse polímero apresenta atividade inibitória, in vitro, contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, patogênicas de importância em saúde pública e muitas de origem alimentar (HAYES et al., 2008; SHIH-BING, 2009; RAMÍREZ, 2011).

A atividade antibacteriana dos polímeros de quitosana varia de acordo com o peso molecular, grau de desacetilação e sensibilidade do microrganismo (SHIH-BIN, 2009; CORTEZ-VEJA et al., 2013). Badawy e Rabea (2009) ao testarem quitosana com diferentes pesos moleculares (0,25 e 0,5 mg/mL) sobre o crescimento micelial de *Botrytis cinerea* do tomate, relataram que quanto menor o peso molecular da quitosana, maior a atividade antifúngica. Resultado semelhante foi encontrado por Hernández-Lauzardo et al. (2008) ao avaliarem o efeito dos diferentes pesos moleculares (1,0; 1,2 e 2,0 mg/mL) de quitosana sobre *Rhizopus stolonifer* do tomate, verificaram que o baixo peso molecular foi mais eficiente na

inibição do crescimento micelial, enquanto o alto peso molecular reduziu a esporulação, germinação e alterou a morfologia dos conídios.

A quitosana tem sido reconhecida como um antimicrobiano natural com características físico-químicas que resultam em propriedade de fácil formação de gel. Tais géis, quando aplicados sobre alimentos formam filmes protetores comestíveis com estrutura nanoporosa e invisíveis que se aderem aos alimentos (AIDER, 2010).

REFERÊNCIAS

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne - ABIEC. 2011. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/download/EXP%20JAN%20-%20DEZ%2010.pdf>>. Acesso em: 15 de dez. 2014.

ABRAM, A.P.; HIGUERA, I. Em Quitina y quitosano: obtencion, caracterizacion y aplicaciones; 1 ed.; Programa Cytel 2004, - Pontificia Universidad Catolica del Peru/Fondo Editorial: Lima, 2004, cap 1.

ABREU, F.O.M.S., CAVALCANTE, L.G., DOUDEMANT, P.V., CASTRO, A.M., NASCIMENTO A.P. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 630-635, 2013.

AIDER, M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. Review. **Food Science and Technology**, Canadá, v. 43, n.6, p. 837-842, 2010.

AIROLDI, C. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. **Química Nova**, São Paulo, v.31, p.144-153, 2008.

ALMEIDA, R.B. DINIZ, W.J.S.; SILVA, P.T.V.; ANDRADE, L.P.; DINIZ, W.P.S.; LEAL, J.B.G.; BRANDESPIM, D.F. Condições higiênico-sanitárias da comercialização de carnes em feiras livres de Paranaíba, PE. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 585-592, 2011.

ARAÚJO, H.S.; SABBAG, O.J.; LIMA, B.T.; ANDRIGHETTO, C.; RUIZ, U.S. Aspectos econômicos da produção de bovinos de corte. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 82-89, 2012.

ASSIS, O.B.G.; DOUGLAS, B. Processo Básico de Extração de Quitina e Produção de Quitosana a partir de Resíduos da Carcinicultura. Embrapa

Instrumentação Agropecuária. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.14. n.1 p.91-100, 2008.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; LIA FOOK, M.V.; COSTA, A.C.F.M. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v.2. n. 3, p. 27-34, 2007.

BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology Technology**, Netherlands, v. 51, n1, p. 110-117, 2009.

BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Harrogate, v.56, p.290-299, 2010.

BARBOSA, T.C.R. **Surtos de algumas doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 64 f. Monografia (Pós Graduação em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 3, p. 323-333, 2006.

BARROS, L.S.S.; VIOLANTE, P.C. Microbiologia da carne bovina “in natura” comercializada nas feiras livres do recôncavo baiano. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 08, n. 3, p. 185-197, 2014.

BORGONGNONI, C.F.; POLAKIEWICZ B.; PITOMBO R.N.M. Estabilidade de emulsões de D-limoneno em quitosana modificada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.3, p. 502-508, 2006.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento de alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 17 de maio 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim eletrônico epidemiológico – Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC nº 12, de 12 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 12 de jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília: MS; 2012. Disponível em: <http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/pnan2011.pdf>. Acesso em: 12 de maio 2015.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998, republicada no Diário Oficial da União de 22 de março de 1999. Aprova Regulamento Técnico: “Atribuição de função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – carne e produtos cárneos”. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos>. Acesso em: 16 de maio 2015.

BRONER, S.; TORNER, N; DOMINGUEZ, A; MARTÍNEZ, A; GODOY, P. Sociodemographic inequalities and outbreaks of foodborne diseases: An ecologic study. **Food Control**, Guildford, v.21, n.6, p. 947-951, 2010.

BUSO, E.K.R.P.M.; CLEMENTE, E.; ESTRADA, K.R.F.S.; ZÁRATE, N.A.H.; OLIVEIRA, J.S.B. Comportamento pós-colheita de mandiocinha-salsa revestida com Quitosana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 4, p. 850-855, out./dez. 2014.

CAMPOS, R.P. KWIATKOWSKI, A., CLEMENTE, E. Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n.5, p. 554-560, 2011.

CARDOSO, R.C.V.; SOUZA, E.V.A.; SANTOS, P.Q. Unidades de alimentação e nutrição nos campi da Universidade Federal da Bahia: um estudo sob a perspectiva do alimento seguro. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 5, p. 669-680, 2005.

Center for Food Safety and Applied Nutrition - CFSAN, "Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook" 2ªEd, U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2009.

CHONG, J.X.; LAI, S.; YANG, H. Chitosan combined with calcium chloride impacts fresh-cut honeydew melon by stabilising nanostructures of sodium-carbonate-soluble pectin. **Food Control**, Guildford, v.53, p.195 – 2015, 2015.

CORTEZ-VEJA, W.R.; PIOTROWICZ, I.B.B.; PRENTICE, C.; BORGES, C.D. Conservação de papaia minimamente processados com a utilização de revestimento comestível baseado em goma xantana. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1753-1764, 2013.

COSTA, L.V. Fatores associados à segurança alimentar nos domicílios brasileiros em 2009. **Economia e Sociedade**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 373-394, 2014.

COUTINHO, E.P.; SILVA, M.J.; FRANCISCO, M.S.; SILVA, J.M.S.; AZEREDO, L.P.M.; OLIVEIRA, A.T. Avaliação das condições higiênico-sanitárias da manipulação e comercialização de carnes vermelhas e aves nas feiras livres dos municípios de Bananeiras e Solânea, PB. In: **II Jornada Nacional de Agroindústria**. 2007.

CRUZ, C.D.; MARTINEZ, M.B.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.2, p.195-206, 2008.

DAINTY, R.H.; MACKEY, B.M. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. **Journal of Applied Bacteriology**, Bedford, v. 73, p.103-114, 1992.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DWIGHT, C.H.; YUAN, C.Z. **Microbiologia veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

EDUARDO, M.B.P.; KATSUYA, E.M.; BASSIT, N.P. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Água e Alimentos. **Manual de Investigação Epidemiológica dos Surto** – Método Epidemiológico de Investigação e Sistema de Informação/2008. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 03 de agosto de 2015.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

FAI, A.E.C.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, T.L.M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polimeros**, Biobao, v.9, n.5, p.435-451, 2000.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food borne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook: Salmonella spp**. Disponível em: <<http://www.efsa.fda.gov>>. Acesso em: 15 maio 2015.

FENNEMA, O.R. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1993. **Guia SUS do cidadão**. Secretaria de Estado da saúde RJ. Precauções específicas: leite e derivados, chocolate, água, bebidas, carne e derivados, pescado e derivados, congelados, produtos naturais e produtos clandestinos. Atenção à sua saúde. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/guia_sus_cidadao/pg_61.shtml>. Acesso em: 05 nov. 2015.

FERNANDEZ, M.M.; MARZI, M.C.; BERGUER, P.; BURZYN, D.; LANGLEY, R.J.; PIAZZON, I.; MARIUZZA, R.A.; MALCHIODI, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. **Molecular Immunology**, Bethesda, v.43, p.927-938, 2006.

FERNÁNDEZ-SAIZ, P; SÁNCHEZ, G.; SOLER, C.; LAGARON, J.M.; OCIO, M.J. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. **Food Control**, Valencia, n. 34, p. 61-68, 2013.

FLORES, A.M.P.C.; MELO, C.B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.37, n.1, p.65-72, 2015.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Food borne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook: *Salmonella* spp.** 2015. Disponível em: <<http://www.efsa.fda.gov>>. Acesso em: 15 maio 2015.

FRÁGUAS, R.M.; ROCHA, D.A.; QUEIROZ, E.R.; ABREU, C.M.P.; SOUSA, R.V.; OLIVEIRA, Ê.N.J. Caracterização química e efeito cicatrizante de quitosana, com baixos valores de massa molar e grau de acetilação, em lesões cutâneas. **Polímeros**, São Carlos, v. 25, n.2, p. 205-211, 2015.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, p.182. 2008.

FRANCO, L.O.; STAMFORD, M.T.C.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**, São Paulo, v. 14, n. 54, p. 52-56, 2005.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Bethesda, v.113, p.1-15, 2007.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. **Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2ª Ed. New York: Springer, p. 399, 2004.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Manole, 2008.

GOOSEN, M.E.A. Applications of chitin and chitosan, **Technomic Publishing Company**, Lancaster ,1996.

GYLES, C.C.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THEON, C.O. **Pathogenesis of Bacterial Isolation in animals**, 3 ed UK Blackwell Publishing. p. 23-411, 2004.

GREIG, J.D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International journal of food microbiology**, Bethesda, v. 130, n. 2, p. 77–87, 2009.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P.A.; WEILL, F.X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Bethesda, v.161, n.1, p. 26–29, 2010.

HAYES, M.; CARNEY, B.; SLATER, J.; BRÜCK, W. Mining marine shellfish wastes for bioactive molecules: Chitin and Chitosan- Part B: Applications. **Journal of Biotechnology**, Bethesda, v.7, n.3, p.878-89, 2008.

HATAKKA, M.; BJÖRKROTH, K.J.; ASPLUND, K.; MÄKI-PETÄYS, N.; KORKEALA, H.J. Genotypes and enterotoxicity of isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. **Journal of Food Protection**, Bethesda, v. 11, p. 1487-1491, 2000.

HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.N.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M.G; MÉNDEZ-MONTEALVO, M.G.; SÁNCHEZ-RIVERA, M.M.; BELLO-PÉREZ, L.A. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.73, p.541-547, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=291820>. Acesso em: 15 de nov. 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Em 30 anos, importantes mudanças nos hábitos de consumo dos brasileiros, 2013. Disponível em: <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticiasview=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=171>>. Acesso em: 18 de dez. 2014.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/comentario.pdf. Acesso em: 12 de dez. 2014.

JAY J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

JONES, T.F.; INGRAM, L.A.; CIESLAK, P.R.; VUGIA, D.J.; TOBIN-D'ANGELO, M.; HURD, S.; MEDUS, C.; CRONQUIST, A.; ANGULO, F.J. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. **Journal of Infectious Diseases**, Bethesda, v.198. n.1. p.109–14, 2008.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Bethesda, v.62, p.3-11, 2010.

KUNIYOSHI, J.N. La Quitosana. **Revista de Química PUCP**, v. 26, n.1-2, 2012. Disponível em: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/viewFile/6421/6476> >. Acesso em: 23 de nov. 2013.

LAWRIE, R.A. **Ciência da Carne**. 6. ed. Porto Alegre: Atmed, p. 1-384, 2005.

LEE, K.M.; RUNYON, M.; HERRMAN, T.J.; PHILLIPS, R.; HSIEH, J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safet. **Food Control**, Guildford, v.47, p.264-276, 2015.

LITTLE, C.L.; GORMLEY, F.J.; RAWAL, N.; RICHARDSON, J.F. A recipe for disaster: outbreaks of campylobacteriosis associated with poultry liver pate in England and Wales. **Epidemiology & Infection**, Bethesda, v.138, p.1691-1694, 2010.

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

MANTILLA, S.P.S. Importance of *Listeria monocytogenes* on foods from animal origin. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n.1, p.180-192, 2007.

MARICATO, E.S.O. **Desenvolvimento de filmes de quitosana insolúveis em meio ácido com atividade antioxidante**. 113 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Departamento de Química. Universidade de Aveiro: 2010.

MARTH, E.H. Disease characteristic of *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Oxford, v. 42, n.51, p.165-168, 1988.

MASCARENHAS, G.; DOLZANI, M.C.S. Feira Livre: Territorialidade popular e cultura na metrópole contemporânea. **Revista Ateliê Geográfico**, Goiânia, v.2, n.4, p.72-87, 2008.

MATSUI, M. **Correlações entre estrutura química, superestrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano**. 119 f. Tese (Doutorado) - UFP, Pós-graduação em engenharia, Curitiba, PR: 2007.

MEDEIROS, S.R. Valor nutricional da carne bovina e suas implicações para a saúde humana. **Embrapa Gado de Corte**. Campo Grande, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc171/DOC171.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

MINNAERT, A.C.S.T.; FREITAS, M.C.S. Práticas de higiene em uma feira livre da cidade de Salvador (BA). **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.15. n.1, p.1607-1614, 2010.

MOLINA, L.R. Utilização da vacina *Escherichia coli* J5 na imunização de vacas leiteiras contra mastites causadas por *E. coli*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.33, n.3, p.291-298, 2013.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L.A.A. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Revista de ciências exatas e engenharias**, Rio Grande, v.16. p. 37- 45, 2006.

MURRAY, P. R. et al. *Listeria*, *Erysipelothrix* e outros bacilos Gram-positivos. In: **Microbiologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 27, p. 181-184, 2000.

MUZZARELLI, R.A.; BOUDRANT, J.; MEYER, D.; MANNO, N.; DEMARCHIS, M.; PAOLETTI, M.G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, foodpreservation, glucans, pectins and inulin: a tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.87, n.2, p. 995-1012, 2012.

NITRINI, S.M.O.O.; TOLEDO, F.C.P.; FREIRE, J.J.B.; RODRIGUES, A.P.O.; NOGUEIRA, H.R.; MONTI, E.J. Determinação de nitritos e nitratos e linguiças comercializadas na região de Bragança Paulista. **Lecta**, Braganca Paulista, v.18, n.1, p. 91-96, 2000.

NITSCHKE, J.; ALTENBACH, H.; MALOLEPSZY, T.; MÖLLEKEN, H. A new method for the quantification of chitin and chitosanin edible mushrooms. **Carbohydrate research**, Barking, v. 346, n. 11, p. 1307-1310, 2011.

OLIVEIRA, J.D.; SILVA, T.R.S.; CORREIA, M.G.S. Fatores Determinantes da Qualidade Nutricional da Carne Bovina. **Cadernos de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v. 1, n.16, 2013.

OLIVEIRA, J.J.; REZENDE, C.S.M.; OLIVEIRA, A.P.; MOREIRA, N.M.; FREITAS, F.A. Surtos alimentares de origem bacteriana. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.17. 2013.

OLIVEIRA, N.M.S; NASCIMENTO, L.C.; FIORINI, J.E. Isolamento e identificação de bactérias facultativas mesofílicas em carnes frescas bovinas e suínas. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.91, p.68-74. 2002.

OLIVEIRA, J.L. **Fotodegradação de corantes têxteis e aplicação da quitosana como tratamento terciário destes efluentes**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química. Departamento de Química - Centro de Ciências Exatas. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2006.

ORGAZ, B.; PUGA, C.H.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V.; SANJOSE, C. Biofilm recovery from chitosan action: A possible clue to understand *Listeria monocytogenes* persistence in food plants. **Food Control**, Guildford, v.32, p.484-489, 2013.

PAIVA, W.S.; NETO, F.E.S.; BATISTA, A.C.L. Avaliação da atividade antibacteriana da quitosana fúngica. **Perspectiva online**, Campos dos Goytacazes, v. 13, n. 4, p. 37-43, 2014.

PEREIRA, P.M.R.C.; PINTO, M.F.; ABREU, U.G.P.; LARA, J.A.F. Características de carcaça e qualidade de carne de novilhos superprecoces de três grupos genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.11, p.1520-1527, 2009.

PHILIPPI, S.T. **Nutrição e Técnica Dietética**. 2 ed. Barueri: Manole, 2006.

PINTO, L.A.A. **Quitina e Quitosana obtidas de rejeitos de pescado e aplicações no tratamento de efluentes**. p. 1 - 444, 2011.

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; AUGUSTINI, V.C.M.; WATANABE, M.T.; FERNANDES JR, A.; RALL, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO JR., J.P. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiol**, São Paulo, v.40, p.1067–1073, 2010.

RAPOSO, T.R.S.; ARAÚJO, M.P.N.; FURTUNATO, D.M.N. Avaliação das condições de recebimento de carnes resfriadas e congeladas, em Unidade de Alimentação e Nutrição da cidade de Salvador, BA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 22, n. 158, p. 73-78, 2008.

RAMÍREZ, C.C. Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. **Universidad de Guanajuato**, Guanajuato, v. 21, n. 3, 2011.

RIBEIRO, C.S.; FRAVET, F.F.M. Boas práticas para aquisição, manipulação e armazenamento de alimentos em cozinhas residenciais. **Cadernos de pós-graduação da FAZU**, Uberaba, v. 1, 2010. Disponível em:

<<http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/view/326>>. Acesso em: 12 de mai. 2015.

ROCHA, F.A.G.; ARAÚJO, L.O.; ALVES, K.S.; DANTAS, L.Í.S.; SILVA, R.P.M.; ARAÚJO F.F.. Estafilococos coagulase positivos em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado modelo Nerival Araújo, Currais Novos/RN. **Holos**, Natal, v. 1, n. 84, 2013.

ROLLER, S.; SAGOO, S.; BOARD, R.; O'MAHONY, T.; CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.; FOGDEN, M.; OWEN, M.; FLETCHER, H. Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. **Meat Science**, Bethesda, v. 62, n. 2, p. 165-177, 2002.

ROSINA, A.; MONEGO, F. Avaliação microbiológica da carne bovina moída nas redes de supermercados de canoinhas/SC. **Saúde Meio Ambiente**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 55-64, 2013.

RUBIN, L.; WAQUIL, P. Estrutura exportadora do agronegócio e impactos socioeconômicos para os países do cone sul. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v.51, n.1, 2013.

SANTANA, M.C.C.B.; MACHADO, B.A.S.; PEREIRA, L.O.; DRUZIAN, J.I. Processo de remoção de metais pesados derivados de mandioca por meio da utilização de quitosana. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v.6, n.4, p.543-552, 2013.

Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde – SVS/MS. Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2011. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf Acesso em: 12 de abr. 2014.

SHEKARFOROUSH, S.S.; BASIRI, S.; EBRAHIMNEJAD, H.; HOSSEINZADEH, S. Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat. **International Journal of Biological Macromolecules**, Bethesda, v. 76, p. 303 – 309, 2015.

SHIH-BIN, L.; SHAN HE, C.; KOU CHENG, P. Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of β -chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Tóquio, v.89 p. 238-244, 2009.

SILVA, E.P.; BERGAMINI, A.M.M.; OLIVEIRA, M.A. Alimentos e agentes etiológicos envolvidos em toxinfecções na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil – 2005 a 2008. **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v.7, n.77, p.4-10, 2010.

SILVA, J.C.; FURTADO, L.F.V.; FERRO, T.C.; BEZERRA, K.C.; BORGES, E.P.; MELO, A.C.F.L. Parasitismo por *Ascaris lumbricoides* e seus aspectos epidemiológicos em crianças do Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**, Uberaba, v. 44, n. 1, p. 100-106, 2011.

SILVA, M.C.; FIDELES, T.B.; FOOK, M.V.L. Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação ionotrópica: influência da incorporação do fármaco. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 10, n. 1, p. 21 - 28, 2015.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2014. Disponível em: < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em: 23 de julho de 2015.

SOARES, N.F.F.; SILVA, D.F.P.; CAMILLOTO, G.P.; OLIVEIRA, C.P.; PINHEIRO, N.M.; MEDEIROS, E.A.A. Uso de revestimento comestível e conservação pós-colheita de goiaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 281 - 289, 2011.

SOUSA, C.P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista Atenção Primária a Saúde**, Juiz de Fora, v. 9, n. 1, p. 83-88, 2006.

SOUSA, W.J.B.; FILGUEIRA, P.T.D.; SANTOS, A.T.; FERREIRA, V.P. Desenvolvimento de filmes de quitosana com incorporação de vitamina E. **Scire**, Campina Grande, v. 6, n.1, 2015.

SOUSA, T.M.; NETO, A.C.; HERNANDES, T.; SOUTO, P.C.S. Microrganismos patogênicos e indicadores de condições higiênico-sanitária em carne moída comercializada na cidade de Barra do Garças, MT. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoro, v.6, n.2, p.124-130, 2012.

TASKIN, P.; CANISAG, H.; SEN, M. The effect of degree of deacetylation on the radiation induced degradation of chitosan. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v.94, p. 236-239, 2014.

TORRES, A.A. Microesferas de quitosana para utilização como sistemas de liberação controlada de fitoterápicos. **IV CONNEPI - Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica**. Belém, 2009.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1 - 934, 2012.

WANG, L.; ZHAO, L.; YUAN, J.; JIN, T.Z. Application of a novel antimicrobial coating on roast beef for inactivation and inhibition of *Listeria monocytogenes* during storage. **International Journal of Food Microbiology**, Bethesda, v.211, p. 66 – 72, 2015.

WILLIAMS, N.D.; TORRES, A.G; LLOYD, S.J. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America, University of Texas: **Bentham Science Publishers Ltd.**, p. 8-24, 2010.

WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.; PROCOP. G.W.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G.L. **Koneman, diagnóstico microbiológico : texto e atlas colorido**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ZHU, L.; FENG, X.; ZHANG, L.; ZHU, R.; LUO, X. Prevalence and Serotype of *Listeria monocytogenes* contamination in chinese beef processing plants. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v.9, n.6, p.556-560, 2012.

Capítulo 2

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E CONDIÇÕES
HIGIENICOSSANITÁRIAS DE CARNE BOVINA COMERCIALIZADA
NA FEIRA LIVRE DE JIQUIRIÇÁ, BAHIA**

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO À REVISTA CIÊNCIA AGRONÔMICA

Análise microbiológica e condições higienicossanitárias de carne bovina comercializada na feira livre de Jiquiriçá, Bahia

*Alessandra Santana Silva¹; Norma Suely Evangelista-Barreto²; Adriana Pereira Sampaio¹;
Marly Silveira Santos¹; Bartolomeu Warlene Silva de Souza³

- 1- Estudante de mestrado do Programa de pós-graduação em Microbiologia agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. *E-mail: alessandraufrb@hotmail.com.
- 2- Docente do Programa de pós-graduação em Microbiologia agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
- 3- Docente do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará.

Resumo: O presente estudo objetivou avaliar as condições higienicossanitárias da carne bovina comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá - Bahia, bem como realizar contagem de estafilococos coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* spp. Foram avaliados 10 boxes de vendas, nos quais se analisou 30 amostras de carne bovina in natura. Em todos os pontos de venda, a carne se encontrava exposta a risco de contaminação, como a manipulação do gênero alimentício pelos consumidores no momento de escolha do corte e manipulação simultânea da carne e de dinheiro pelos açougueiros. Os maiores índices de inadequação foram referentes à comercialização e exposição das carnes, em que 78,9% dos itens avaliados se encontravam em desacordo com as legislações RDC n° 275 e RDC n° 216 da ANVISA. Os quesitos relacionados às instalações, equipamentos e utensílios, apresentaram 54,5% de inadequação. As carnes eram expostas em temperatura ambiente, apresentando temperaturas interna muito acima das permitidas por lei (24 a 28°C). Todas as amostras apresentaram contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva, com contagens de 3,8 a 6,1 log UFC/g. *Salmonella* spp foi identificada em 30% das amostras analisadas. A carne bovina comercializada na feira livre estudada se encontra imprópria para o consumo humano, constituindo assim, risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: *Salmonella*, *Staphylococcus*, temperatura.

Microbiological analysis and sanitary hygienic conditions of beef marketed in the open market of Jiquiriçá, Bahia

Abstract: This study aimed to assess the sanitary hygienic conditions of the beef sold in the open market in the city of Jiquiriçá - Bahia as well as perform counting coagulase positive *Staphylococcus* and *Salmonella* spp search. We evaluated 10 tents of sales, in which analyzed 30 samples of fresh beef. At all points of sale, the flesh lay exposed to risk of contamination, such as handling of foodstuff by consumers at the time of choosing the court and simultaneous handling of meat the money by butchers. The greatest inadequacy

rates were referring to the sale and display of meats, in which 78.9% of the assessed items were in violation of the laws RDC N°. 275 and RDC N°. 216 Anvisa. The items related to facilities, equipment and utensils, showed 54.5% of inadequacy. The meats were exposed at room temperature, with internal temperatures well above those permitted by law (24°C to 28°C). All samples were contaminated by coagulase-positive *Staphylococcus*, with scores from 3.8 to 6.1 log CFU / g. *Salmonella* was identified in 30% of samples. The beef marketed in the studied street market is unfit for human consumption, thus constituting risk to consumer health.

Key words: *Salmonella*, *Staphylococcus*, temperature.

Introdução

A carne bovina apresenta um elevado teor de proteínas com alto valor biológico, sendo esta uma característica positiva que é determinada pelo seu conteúdo em aminoácidos essenciais e pela digestão dos mesmos. Além disso, as carnes apresentam todas as vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K) e as vitaminas do complexo B. Quanto aos minerais, o ferro é o que mais se destaca nesse gênero alimentício, seguido pelo potássio, sódio, magnésio e zinco, todos essenciais ao ser humano (OLIVEIRA; SILVA e CORREIA, 2013). A água é o componente mais abundante da carne e um dos principais responsáveis pelas características de suculência e maciez (CHENG e SUN, 2008).

A carne bovina faz parte dos hábitos alimentares do brasileiro e desempenha importantes funções no organismo humano, pois é responsável pela formação de novos tecidos orgânicos, produção de energia e regulação de processos fisiológicos (OLIVEIRA; SILVA e CORREIA, 2013). No entanto, a carne apresenta características intrínsecas que favorecem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos à população humana, como as bactérias dos gêneros *Samonella* e *Staphylococcus* que têm sido relatadas em surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) (WELKER et al., 2010; ALCÂNTARA; GATTO e KOZUSNY-ANDREANI, 2012).

As bactérias do gênero *Salmonella* estão relacionadas às principais causas de intoxicação alimentar em diversos países, inclusive no Brasil (LEE et al., 2015). Já as

bactérias do gênero *Staphylococcus* são consideradas um dos principais microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares. Este fato está relacionado com a produção de enterotoxinas termo-estáveis capazes de causar gastroenterite em seres humanos (CFSAN, 2009).

No Brasil, de acordo com dados epidemiológicos de 2000 a 2011, dos 1.296 surtos que ocorreram em restaurantes e padarias, a carne bovina foi considerada o alimento mais associado aos surtos, sendo responsável por 358 dos casos em que o alimento foi identificado (SVS, 2011). Nesse sentido, a qualidade higienicossanitária na manipulação das carnes é motivo de preocupação em toda etapa de produção, especialmente no que se refere aos locais de comercialização desse gênero alimentício (NASCIMENTO et al., 2014) em virtude das falhas referentes aos aspectos estruturais e higienicossanitários, muito comum em feiras livres. As carnes comercializadas nesse ambiente apresentam um elevado risco de contaminação microbiana (LUNDGREN et al., 2009), levando à diminuição do tempo de vida útil do produto e elevando o risco de ocasionar toxinfecções alimentares nos consumidores (BARROS e VIOLANTE, 2014).

No município de Jiquiriçá – Bahia, a feira acontece principalmente aos sábados, sendo este o dia que o comércio é mais movimentado e que as pessoas vão mais à feira, seja para comprar ou simplesmente para encontrar amigos ou parentes. Pois, as feiras livres não se configuram apenas como um local de compra e venda, mas também de encontros e lazer, troca de informações, articulações políticas e/ou diversão (ALMEIDA et al., 2011).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar as condições higienicossanitárias da carne bovina comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá - Bahia, bem como realizar contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* spp.

Material e Métodos

No período de abril a dezembro de 2014 foram analisadas amostras de carne bovina in natura em 10 dos 19 boxes de comercialização de carne bovina da feira livre do município de Jiquiriçá - Bahia. A seleção dos boxes foi sistemática e inteiramente casualizada (amostra composta e heterogênea), sendo escolhidos boxes alternados com o intuito de construir o real foco de contaminação microbiana. Este estudo é do tipo transversal de caráter quantitativo e observacional.

A análise dos aspectos higienicossanitários da comercialização de carne bovina, foi realizada por meio de observação visual e aplicação de um *check list* adaptado da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 275 de 21 de outubro de 2002 (BRASIL, 2002) e RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004 da ANVISA (BRASIL, 2004), em que foram analisados os seguintes itens: instalações, equipamentos e utensílios; higiene dos manipuladores; comercialização das carnes e exposição do produto à venda.

Foram realizadas três coletas aos sábados no turno matutino, sendo adquiridas na condição de consumidor 10 amostras em cada coleta, perfazendo um total de 30 amostras de 300g de carne bovina proveniente de diferentes cortes expostos à venda. Após aquisição aferiu-se a temperatura, em seguida, as amostras foram colocadas em sacos plásticos estéreis, identificadas e transportadas em caixas isotérmicas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, onde foram analisadas imediatamente.

No laboratório as amostras foram pesadas assepticamente em porções de 25g e homogeneizadas em 225 mL de solução salina a 0,85%, para pesquisa de *Staphylococcus* e em Caldo Lactose (CL), para pesquisa de *Salmonella*. As mesmas foram homogeneizadas em Blender sanitizado, pulsando-o rapidamente duas vezes (APHA, 2001).

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada por meio da semeadura em superfície no meio agar Baird-Park (Acumedia®), em duplicata, e as colônias típicas foram submetidas aos testes de catalase e coagulase. Para a contagem presuntiva de *Staphylococcus* coagulase positiva foram selecionadas placas contendo de 30 a 300 colônias, as colônias típicas foram contadas manualmente.

Para a pesquisa de *Salmonella*, após o pré-enriquecimento da amostra, em CL (Difco®), e incubação a 37°C por 24 horas, foi inoculado 1 mL e 0,1 mL em 10 mL de caldo Tetratonato (TT) e caldo Rappaport (RV) e incubados a temperatura de 35 °C e 42 °C por 24 horas, respectivamente. Após esse período, alíquotas de cada tubo foram inoculadas em placas de Petri contendo os meios seletivos Agar Xilose-Lisina Desoxicolato XLD (Acumedia®) e Agar *Salmonella Shiguela* (SS) (Himedia®). Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. As colônias com crescimento característico de *Salmonella* foram inoculadas em Agar Ferro Açúcar Triplo (TSI), (Difco®) e Agar Lisina Ferro (LIA) (Himedia®) e incubadas a 35 °C por 24 horas. A partir dos tubos com crescimento positivo (ácido na base e alcalino no ápice) para o meio ágar TSI e alcalino com ou sem produção de H₂S para o meio ágar LIA, foram realizados testes bioquímicos (urease, indol, utilização do citrato e malonato) e sorológicos usando o soro polivalente somático (antígenos O e Vi) da Probac®, para a caracterização do gênero.

A análise dos dados microbiológicos foi baseada nos critérios da Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA.

Os resultados foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA) de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, em duplicata e três repetições. As médias das contagens de microrganismos e das temperaturas internas das amostras de carne bovina in natura foram analisadas utilizando o teste de Tukey. O software utilizado foi o SISVAR versão 4.0 e o nível mínimo de significância considerado foi de 5%.

Resultados e discussão

Os percentuais de conformidade e não conformidade das condições higienicossanitárias por boxes de comercialização de carne bovina in natura se encontra na tabela 1. Onde é possível observar que a maioria dos itens avaliados está em desacordo com a legislação vigente, pois os percentuais de não conformidade variam entre 62% e 78%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre esses valores por boxes ($p > 0,5$).

Tabela1. Percentuais de conformidade e não conformidade das condições higienicossanitárias por boxes de comercialização de carne bovina in natura avaliados na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil.

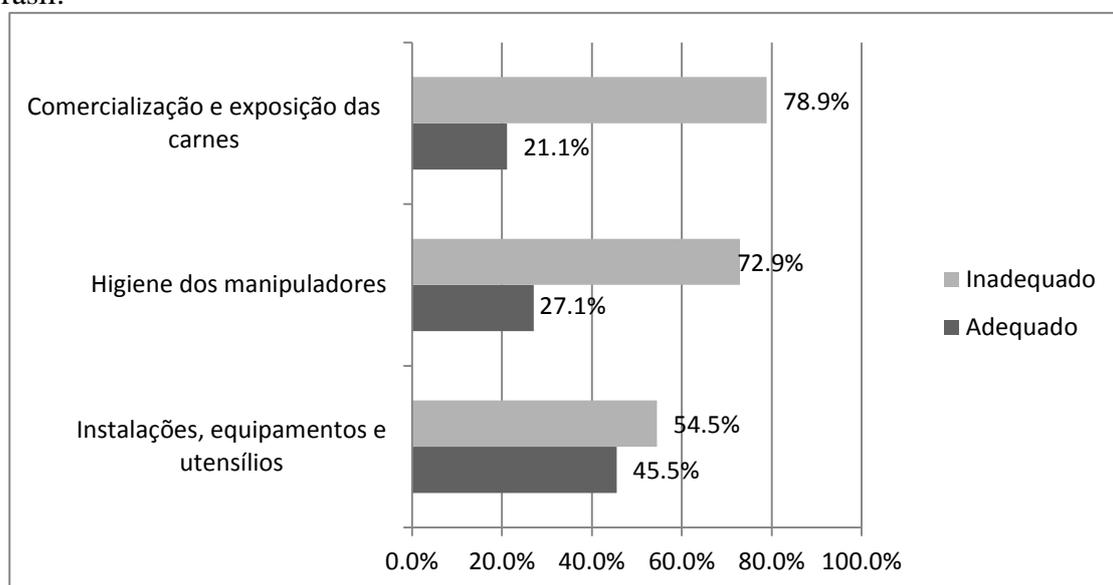
	Boxes Avaliados									
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Conforme (%)	28	32	24	36	30	25	22	38	28	24
Não conforme (%)	72	68	76	64	70	75	78	62	72	76

No quesito comercialização e exposição das carnes 78,9% dos itens avaliados se encontravam em desacordo com a legislação vigente, quanto à higiene dos manipuladores 72,9% estava inadequada e com relação às instalações, equipamentos e utensílios 54,5% apresentaram inadequação (Figura 1). A ocorrência de menor percentual de não conformidade nesses últimos quesitos pode estar relacionado com o fato da estrutura de cada boxe apresentar pia para lavagem das mãos, balcão refrigerado e bancadas com acabamento liso, impermeável e de fácil higienização, conforme exigido pela RDC nº 275 de 2002.

O elevado percentual de inadequação referente à comercialização e exposição das carnes, está associado ao fato de que em 100% dos boxes, as carnes são expostas em temperatura ambiente, mesmo havendo balcões refrigerados em todos os boxes de comercialização de carne bovina in natura. Outros pontos críticos observados durante a

comercialização é que em 100% dos boxes os consumidores manipulam as carnes no momento de escolha do corte e os açougueiros recebem o dinheiro e manipulam a carne ao mesmo tempo, sem lavar as mãos. Além disso, mesmo havendo pia para lavagem das mãos, em 70% dos boxes os açougueiros utilizam toalha de tecido de algodão para limpeza das mãos e a mesma toalha também é utilizada para limpeza de superfícies e equipamentos, isso faz com que o risco de contaminação cruzada aumente. Esta prática também foi observada por Oliveira et al. (2008).

Figura1. Percentuais de adequação e inadequação das condições higienicossanitárias da comercialização de carne bovina in natura na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil.



O hábito dos consumidores tocarem a carne no momento da escolha, está relacionada à avaliação da qualidade do produto, uma vez que um dos aspectos importantes a serem observados na comercialização das carnes são as características físicas ou sensoriais, por estarem associadas com a aceitação e satisfação do consumidor no momento da compra (OLIVEIRA et al., 2011). Nesse sentido, os consumidores geralmente compram os produtos que transmitem confiança e que apresentam boas características organolépticas (ISRAEL et al., 2010).

Quanto à higiene dos manipuladores, 100% não utilizam uniformes de cor clara, limpos e adequado à atividade, nem apresentavam mãos limpas e unhas limpas e curtas; 60% usavam adornos (alianças, relógios etc.) e 20% apresentavam lesão nas mãos. Além disso, em 90% dos boxes verificou-se que os manipuladores conversavam demasiadamente durante a comercialização das carnes. Estando, por tanto, em desacordo com a RDC N° 216 (BRASIL, 2004) que determina que os manipuladores devem apresentar uniformes conservados e limpos, não devem fumar nem falar desnecessariamente, as unhas devem estar curtas e sem esmalte e não devem manipular dinheiro ou praticar outros atos que possam contaminar o alimento. Esses quesitos precisam ser observados pelo consumidor antes da aquisição da carne uma vez que o manipulador tem sido considerado um dos principais responsáveis pela contaminação dos alimentos (CONCEIÇÃO; NASCIMENTO, 2014; ARBOS et al., 2015). Além disso, devem observar se os alimentos estão sendo comercializados em temperaturas adequadas (ARBOS et al., 2010), pois os principais fatores de risco para contaminação e proliferação microbiana nos alimentos estão relacionados à falta de higiene pessoal, manipulação inadequada, contaminação cruzada e o binômio tempo e temperatura (PICHLER; ZIEGLER; ALDRIAN, 2014).

Segundo o Decreto-Lei n.º 207 (BRASIL, 2008), as carnes e seus produtos devem estar permanentemente protegidos da ação dos raios solares, poeiras ou quaisquer outras sujidades externas e do contato com o público. Além disso, durante a distribuição/comercialização, as carnes devem ser mantidas às temperaturas internas exigidas para a sua conservação, ou seja, refrigerada (entre -2°C e 7°C), congelada (temperatura inferior a -12°C, com tolerância máxima de 3°C) ou ultracongelada (inferior a -18°C).

Além da exposição da carne bovina in natura a diversos contaminantes, na feira livre de Jiquiriçá este gênero alimentício é mantido em temperatura ambiente durante topo

período de comercialização. A temperatura interna das amostras dos cortes de carne avaliados se encontra na tabela 2 e não está em conformidade com o Decreto-Lei, o que favorece a proliferação microbiana, principalmente por estar entre 5 - 60°C, zona de perigo quanto ao crescimento de patógenos (BRASIL, 2004). Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira et al. (2010), em feiras livres de municípios da Zona da Mata na região Norte-PE, em que as carnes eram comercializadas em temperatura ambiente. Isso mostra que nas feiras livres continua sendo permitida a venda de produtos perecíveis, como a carne, em temperatura ambiente (BARROS; VIOLANTE, 2014; SALES, et al., 2014).

Tabela 2. Temperatura das amostras de carne bovina in natura comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil.

Coletas	Boxes Avaliados									
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
1° coleta	25 °C	27 °C	24 °C	25 °C	26 °C	25 °C	25 °C	27 °C	28 °C	26 °C
2° coleta	26 °C	25 °C	28 °C	27 °C	26 °C	27 °C	28 °C	24 °C	25 °C	27 °C
3° coleta	27 °C	24 °C	25 °C	28 °C	27 °C	24 °C	26 °C	25 °C	27 °C	28 °C

As análises microbiológicas apresentaram contagens elevadas de *Staphylococcus* coagulase positiva, acima de 3,8 log UFC/g (Tabela 3) em todos os boxes de comercialização de carne bovina in natura, sem diferença estatística significativa pelo teste F da ANOVA ($p > 0,5$). A detecção de *Staphylococcus* coagulase positiva em níveis elevados é considerado bioindicador da qualidade sanitária inadequada dos alimentos e sugere que esses produtos passaram por excessivo processo de manipulação (LUNDGREN et al., 2009).

Embora a legislação brasileira não estabeleça limites para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em carne bovina in natura, a determinação de limites máximos para contagem dessa bactéria nesse alimento é necessária, pois a carne bovina muitas vezes é consumida sem passar por um tratamento térmico adequado capaz de

inativar as toxinas termotolerantes produzidas por algumas cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva. Essas toxinas podem promover o aumento do peristaltismo intestinal e causar inflamação em todo o trato gastrointestinal, sendo as lesões mais graves no estômago e parte superior do intestino delgado de humanos (BRASIL, 2010; KONEMAN, 2010). Considerando que essas toxinas são produzidas entre 10°C e 45°C (JAY, 2005), as temperaturas em que as carnes são comercializadas na feira de Jiquiriçá além de favorecer a multiplicação do microrganismo, permitem a produção de suas toxinas no alimento. Esses fatores têm contribuído para o envolvimento de *Staphylococcus* coagulase positiva em 20% dos surtos alimentares registrados no Brasil nos últimos anos (BRASIL, 2009).

Tabela 3. Contagem média de *Staphylococcus* coagulase positiva e presença de *Salmonella* spp em carne bovina in natura comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil.

MICROORGANISMOS	BOXES AVALIADOS									
	(Log UFC/g)									
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	5,8	5,6	5,6	5,6	4,7	6,1	5,8	4,9	5,3	5,4
<i>Salmonella</i> spp	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+

- = Ausência de *Salmonella* spp

+ = Presença de *Salmonella* spp

RDC n°12 02/01/2001, preconiza ausência de *Salmonella* spp. em 25g de carne bovina in natura.

Quanto a pesquisa de *Salmonella* spp, foi possível identificar sua presença em 30% (09) das amostras estudadas, distribuídas em 50% (05) dos boxes (Tabela 2), estando inadequadas para o consumo de acordo com a RDC n°12 (BRASIL, 2001) que estabelece ausência de *Salmonella* sp. em 25g do produto analisado. Esses valores estão bem acima dos encontrados por Silvestre et al. (2013), no município de Alexandria-RN, que das 35 amostras de carne bovina in natura comercializadas em feiras livres e supermercados eles identificaram presença de *Salmonella* spp em 8,5% e 2,8%, respectivamente.

As precárias condições higienicossanitárias durante a manipulação e comercialização dos alimentos nas feiras livres são fatores que propiciam a contaminação e multiplicação de microrganismos causadores de DVAs (ALMEIDA; PENA, 2011; NICOLAU et al., 2014). No presente estudo, todos os cinco boxes que apresentaram contaminação por *Salmonella* spp nos cortes de carne analisados encontram-se em condições higienicossanitárias precárias. Estes foram os que apresentaram maior percentual de não conformidade dos itens avaliados (\geq a 72%), mostrando que precárias condições higienicossanitárias identificadas com a aplicação do *check list* evidenciam os resultados obtidos com a análise microbiológica. No entanto essa correlação não foi estatisticamente significativa ($p > 0,5$).

Um dos problemas para melhoria do controle higienicossanitário dos produtos de origem animal comercializados em feiras livres no Brasil, é a resistência por parte dos feirantes em adequar suas práticas higiênicas, uma vez que, os hábitos de higiene, são herdados e transmitidos por gerações de feirantes. Essas práticas não são mudadas facilmente apenas com a determinação de normas, com a oferta de cursos esporádicos ou a realização de ações coativas de fiscalização e controle. Essas ações têm pouca influência na mudança dos hábitos de higiene dessa categoria. Para eles, a ideia central de contaminação está associada à alteração nas características visíveis do produto e não à presença de um contaminante biológico ou químico. Nesse sentido, a feira é um espaço de significações que necessita ser entendido para que as intervenções sanitárias sejam viáveis. Uma vez que, para muitos vendedores, a limpeza do lugar é utilizada como estratégia de marketing e não como um aspecto de saúde. Para eles, deve-se manter a limpeza para atrair clientes e não porque a falta de higiene contamina o alimento e provoca doenças (MINNAERT; FREITAS, 2010; AMOR et al., 2012). Isso faz com que a carne que é comprada, por muitos com dificuldades, pode, ao invés de trazer benefícios à saúde do

consumidor, ser um foco de contaminações, podendo se tornar um problema de saúde pública (OLIVEIRA; SILVA; CORREIA, 2013).

Nesse sentido, a atuação dos serviços de saúde e vigilância sanitária é extremamente importante. É indispensável à inclusão de projetos educativos no setor alimentício, tendo em vista que a maioria dos surtos ocorre pela falta ou pouco conhecimento dos manipuladores em relação às consequências da manipulação inadequada (OLIVEIRA et al. 2008). Uma vez que as leis sanitárias não são efetivas, pois na maioria das vezes, os fiscais municipais adotam apenas medidas coercitivas e punitivas, em detrimento de uma via dialógica com os feirantes (ALMEIDA; PENA, 2011).

CONCLUSÕES

As carnes comercializadas em todos os pontos de venda encontravam-se expostas às diversas fontes de contaminação, estavam sendo manipuladas e comercializadas fora das normas higienicassanitárias estabelecidas pelas resoluções vigentes no país.

Em virtude da elevada contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp., evidencia-se que o produto estudado apresenta risco à saúde do consumidor, caso não haja um tratamento térmico eficiente.

Faz-se necessário, portanto, a padronização dos limites aceitáveis para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em carne bovina in natura, a fim de definir mais um parâmetro para avaliar se esse alimento está seguro para o consumo humano.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R.B.; SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, T.C.M. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.10, n.5, 2009.

ALMEIDA, R. B.; DINIZ, W. J. S.; SILVA, P. T. V.; ANDRADE, L. P.; DINIZ, W. P. S.; LEAL, J. B. G.; BRANDESPIM, D. F. Condições higiênico-sanitárias da comercialização de carnes em feiras livres de Paranatama, PE. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 22, n. 4, p. 585-592, out./dez. 2011.

ALMEIDA, M. D.; PENA, P. G. L. Feira livre e risco de contaminação alimentar: estudo de abordagem etnográfica em Santo Amaro, Bahia. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.35, n.1, p.110-127 jan./mar. 2011.

AMOR, A. L. M.; SILVA, R. M.; SILVA, A. A. M. R.; ARAÚJO, W. C.; OLIVEIRA, A. J.; ALMEIDA, J. S.; SILVA, A. S.; ROCHA, E. V. S.; REBOUÇAS, L. T.; SILVA, I. M. M. Perfil de manipuladores e consumidores de hortaliças provenientes de feiras livres e supermercados. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v.36, n.3, p.792-815, jul./set., 2012.

ARBOS, K. A.; MARTINS, A. M. A.; ALMEIDA, I. K. C.; OLIVEIRA, P. M. L.; FARIAS, L. R. G. Avaliação diagnóstica das condições higienicossanitárias das cantinas em câmpus universitário público, João Pessoa/PB, Brasil. **Revista contexto & saúde**, Ijuí, v.15, n.28, p. 84-94, jan./jun., 2015.

BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology Technology**, v. 51, n.1, p.110-117, jan. 2009.

BARROS, L. S. S.; VIOLANTE, P. C. Microbiologia da carne bovina “in natura” comercializada nas feiras livres do recôncavo baiano. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 08, n. 3, p. 185-197, jul. /set., 2014.

BESSA-JUNIOR, A.P.; GONÇALVES, A.A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. **Actapesca**, v.1, n.1, p.13-28, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto-Lei n.º 207/2008. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 23 de out. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC n.º 12, de 12 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 10 de jan. 2011.

BRASIL. Ministério da saúde. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Brasília, 2010. 158p.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Análise epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil – 2000 a 2014. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf. Acesso em: 21 de dez. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília: MS; 2012. Disponível em: <http://189.28.128.100/nutricao/docs/geral/pnan2011.pdf>. Acesso em: 12 de maio 2015.

BRASIL. Resolução - RDC N.º 275, de 21 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**. Brasília, 23 de outubro de 2003.

BRASIL. Resolução-RDC N.º 216, de 15 de setembro de 2004. **Diário Oficial da União**. Brasília, de 18 de dezembro de 2006.

ALBUQUERQUE, R.B.; SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, T.C.M. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.10, n.5, 2009.

CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - CFSAN (2009), “Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook” 2ªEd, U.S. Food and Drug Administration (FDA).

CHONG, J. X., LAI, S.; YANG, H. Chitosan combined with calcium chloride impacts fresh-cut honeydew melon by stabilising nanostructures of sodium-carbonate-soluble pectin. **Food Control**, v.53, p. 195 – 205, jul. 2015.

DORTA, C.; KADOTA, J. C. P.; NAKAMATSU, M. S. I. Qualidade microbiológica de carnes bovinas embaladas a vácuo e das vendidas a granel. **Revista analytica**, n. 74, Jan., 2015.

EDUARDO, M. B. P.; KATSUYA, E. M.; BASSIT, N. P. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Água e Alimentos. **Manual de Investigação Epidemiológica dos Surtos – Método Epidemiológico de Investigação e Sistema de Informação/2008**. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br>. Acesso em: 03 de agosto de 2015.

Fernández-Saiz, P; Sánchez, G.; Soler, C.; Lagaron, J.M.; Ocio, M.J. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. **Food Control**. n. 34, p. 61-68, 2013.

FERREIRA, F.R.B.et al. Condições higiênico-sanitárias das carnes comercializadas em feiras livres de municípios da zona da mata norte-PE. 2010. In: X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE, 10. 2010.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008.

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KUNIYOSHI, J.N. La Quitosana. **Revista de Química PUCP**, vol.26, n.1-2, 2012.

LEE, K. M.; RUNYON, M., HERRMAN, T. J., PHILLIPS, R., HSIEH, J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, Guildford, v.47, p.264-276, jan., 2015.

LUNDGREN P. U., SILVA, J. A., MACIEL, J. F., FERNANDES, T. M. Perfil da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa/PB-Brasil. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.1, p. 113-119, jan./ mar. 2009.

MINNAERT, A. C. S. T.; FREITAS, M. C. S. Práticas de higiene em uma feira livre da cidade de Salvador (BA). **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15. n.1, p.1607-1614, 2010.

NASCIMENTO, M. V. D.; GUEDES, A. T. L.; SILVA, H. A.; SANTOS, V. E.P.; PAZ, M. C. F. Avaliação da qualidade microbiológica da carne moída fresca comercializada no mercado central em Campina Grande – PB. **Revista saúde e ciência**, v.3, n.1, p.56-68, 2014.

OLIVEIRA, J. D.; SILVA, T. R. S.; CORREIA, M. G. S. Fatores Determinantes da Qualidade Nutricional da Carne Bovina. **Cadernos de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v. 1, n.16, mar., 2013.

OLIVEIRA, S; SILVA, J. A.; MACIEL, J. F.; AQUINO, J. S. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de carne bovina comercializada em supermercados de João Pessoa. **Alimentação Nutrição**, Araraquara v.19, n.1, p. 61-66, jan./mar., 2008.

PARDI, F.; LEWIS, C. M.; WHITTAKER, J. C. SNP selection for association studies: maximizing power across SNP choice and study size. **Annals of Human Genetics**, v. 69, p. 733 – 746, 2005.

RAMÍREZ, C.C.; SALCIDO, N.M.F.; CANO, R.D.P.; ORTIZ-RODRÍGUEZ, T.; CORONA, J.E.B. Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. **Acta Universitaria**, v.21, n.3, set./dez. 2011.

ROSINA, A.; MONEGO, F. Avaliação microbiológica da carne bovina moída nas redes de supermercados de canoinhas/SC. **Saúde Meio Ambiente**, v. 2, n. 2, p. 55-64, dez., 2013.

SANTOS R.D.; GAGLIARDI A.C.M.; XAVIER H.T.; MAGNONI C.D.; CASSANI R.; LOTTENBERG A.M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.100, p.1-40, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos, GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 edição. São Paulo: Livraria Varela, p. 614, 2010.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2013. Disponível em: [http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_Apresentacao Rejane AlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_Apresentacao_Rejane_AlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf) Acesso em: 10 de jan. 2015.

SOARES, N.F.F.; SILVA, D.F.P.; CAMILLOTO, G.P.; OLIVEIRA, C.P.; PINHEIRO, N.M.; MEDEIROS, E.A.A. Uso de revestimento comestível e conservação pós-colheita de goiaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal , v. 33, n. 1, 2011.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, n.1, p.44-48, 2010.

CAPÍTULO 3

**IDENTIFICAÇÃO DE *Listeria monocytogenes* EM CARNE BOVINA
UTILIZANDO MÉTODOS CONVENCIONAIS E MOLECULARES**

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO BRAZILIAN JOURNAL OF
MICROBIOLOGY

Identificação de *Listeria monocytogenes* em carne bovina utilizando métodos convencionais e moleculares

Alessandra Santana Silva¹; Norma Suely Evangelista-Barreto²; Elizabeth Amélia Alves Duarte²; Thiago Alves Santos de Oliveira²; Bartolomeu Warlene Silva de Souza³

- 1- Estudante de mestrado do Programa de pós-graduação em Microbiologia agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
- 2- Docente do Programa de pós-graduação em Microbiologia agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
- 3- Docente da Universidade Federal do Ceará.

Resumo

Foram analisadas 30 amostras de carne bovina in natura em 10 boxes de comercialização na feira livre de Jiquiriçá, Bahia, Brasil com o objetivo de identificar a presença de *Listeria monocytogenes*. A identificação da espécie foi verificada por testes bioquímicos e molecular com a realização da PCR seguido do sequenciamento genético com as regiões gênicas LM1 e LM2 derivados da sequência listeriolisina e os *primers* iniciadores LL5 e LL6. Do total de amostras analisadas, 26,66% (08) se encontravam contaminadas com o patógeno. Não houve diferença entre a identificação de *L. monocytogenes* pelo método convencional quando comparado a análise molecular. Considerando o elevado grau de letalidade das infecções causadas por *L. monocytogenes*, a carne bovina comercializada na feira livre de Jiquiriçá oferece risco biológico à saúde dos consumidores, uma vez que nem sempre esse alimento passa por tratamento térmico adequado antes de ser consumido.

Palavras chaves: segurança alimentar; qualidade microbiológica; saúde pública.

Introdução

O gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. No entanto, apenas duas dessas espécies são consideradas patogênicas, *L. monocytogenes* para o homem e outros animais e *L. ivanovii* para outros mamíferos (Liu, 2006). *Listeria monocytogenes* é um bastonete Gram-positivo pequeno com extremidades arredondadas, não produtora de esporos ou cápsulas, móvel quando cultivada entre 20 e 25°C e imóvel ou apresenta pouca motilidade a 37°C (CFSAN, 2009). São bactérias resistentes a grandes variações de pH, temperatura e concentrações salinas. Em função destas características, podem estar presentes em vários alimentos e ambientes (Gandhi *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2012).

A pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos pode ser realizada utilizando-se métodos tradicionais, seguidos de caracterização bioquímica, ou por meio de técnicas alternativas. Entre os métodos convencionais de análise microbiológica, encontram-se o método desenvolvido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), usualmente aplicado à análise de carne, produtos cárneos e esfregaços de superfícies, e o método da Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA) (Silva *et al.*, 2010). Como técnicas alternativas para a detecção de *L. monocytogenes*, apresentam-se métodos que podem ser usados após o enriquecimento primário, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (Gasanov; Hughes e Hansbro, 2005; Gandra *et al.*, 2008).

A infecção por *L. monocytogenes* ocorre principalmente por meio da ingestão de alimentos e/ou água contaminados, podendo ser transmitida também pelo contato direto com pessoas ou animais infectados. Além disso, existe ainda a transmissão vertical que classifica as gestantes como grupo de maior risco, uma vez que este tipo de transmissão apresenta alta letalidade abortiva (Fox *et al.*, 2011). A listeriose pode causar infecções severas, como septicemias, encefalite, meningite e aborto, com altas taxas de internação hospitalar e mortalidade, acometendo principalmente pessoas idosas, recém-nascidos, gestantes e indivíduos imunocomprometidos (Parihar *et al.*, 2008; Pal *et al.*, 2008). Os sintomas iniciais geralmente são semelhantes aos da gripe com febre persistente. No entanto, distúrbios gastrointestinais como náuseas, vômitos e diarreia, também podem preceder ou acompanhar as manifestações mais graves da doença (Brasil, 2009).

Em 2008, um surto de listeriose no Canadá, devido ao consumo de carne processada, resultou em 53 casos confirmados, 6 suspeitos e 20 mortes, (Warriner e Nanvar, 2009). No Brasil, as informações referentes à vigilância epidemiológica dos casos de listeriose ainda são escassas, assim como dados relativos à pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos no país. Um levantamento epidemiológico em nível internacional aponta os produtos de origem animal como os principais alimentos envolvidos em surtos causados por *L. monocytogenes* (Uchima *et al.*, 2008).

Considerada uma importante fonte de proteínas de alto valor biológico e de micronutrientes, como o ferro, vitaminas do complexo B e zinco (Oliveira, Silva e Correia, 2013), a carne bovina é um dos produtos de origem animal mais consumido como fonte proteica no Brasil (Rubin e Waquil, 2013). No entanto, sua composição química rica em nutrientes, a elevada atividade de água e o pH, favorecem a proliferação da maioria dos microrganismos, tornando a carne um alimento altamente perecível (Cheng e Sun, 2008).

Esse fato associado às condições higienicossanitárias inadequadas em que muitas vezes a carne bovina é exposta, a exemplo das carnes comercializadas em feiras livres que são mantidas em temperatura ambiente e ao ar livre, favorece a contaminação e a multiplicação de patógenos (Almeida *et al.*, 2011).

A feira livre, além de ser um local de compra, venda e troca de mercadorias, também se configura como um local de encontros, lazer, troca de informações, articulações políticas ou diversão (Almeida *et al.*, 2011). Esses hábitos são comumente observados na população do Vale do Jiquiriçá, em que as feiras acontecem principalmente aos sábados, dia em que as populações rurais se deslocam ao centro urbano para suas compras, movimentando o comércio.

Considerando os aspectos abordados, o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença do patógeno *L. monocytogenes* em carne bovina comercializada na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil, comparando a técnica PCR com o método convencional.

Materiais e Métodos

Trata-se de um estudo transversal desenvolvido na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil no período de abril a dezembro de 2014. A feira livre estudada possuía 19 boxes de comercialização de carne bovina in natura, dos quais foram amostrados 10 (52,63%) boxes. As amostras foram coletadas em três períodos diferentes, sendo adquirida uma amostra de 300 gramas por boxe em cada período, perfazendo um total de 30 amostras. Estas foram escolhidas ao acaso, simulando uma situação real de compra pelo consumidor, individualizadas em sacos plásticos de primeiro uso fornecido pelo próprio estabelecimento, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas contendo gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA para o imediato processamento.

Para o isolamento de *L. monocytogenes* foram homogeneizados 25 g de cada amostra em 225 mL de Caldo Universidade de Vermont (UVM) (Acumedia®) e incubado a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 22 ± 2 horas. Após esse período, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo Fraser (Acumedia®) e incubados a $35^\circ\text{C}/26$ horas. Decorrido esse tempo, dos tubos que apresentaram escurecimento devido a hidrólise da esculina foi retirada uma alçada e estriada por esgotamento em placas contendo Agar Palcom (Acumedia®) e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24-48 horas. As colônias que apresentavam

coloração cinza, esverdeadas, com centro côncavo e rodeadas por um halo negro, devido à hidrólise da esculina foram submetidas à coloração de Gram e aos testes bioquímicos de confirmação: teste de catalase, teste de motilidade, teste de β -hemólise e teste de fermentação de carboidratos (dextrose, xilose, rhamnose, manitol e maltose) (Silva *et al.*, 2010).

A extração do DNA foi realizada a partir da cultura *in vitro* utilizando o kit UltraClean® Microbial DNA Isolation (MoBio, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A integridade e a quantidade do DNA foi verificada usando eletroforese em gel de agarose a 0,8% e o Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectivamente.

As ampliações por PCR foram realizadas com os *primers* LM1 (5'CCTAAGACGCCAATCGAA 3') e LM2 (5'AAGCGCTTGCAACTGCTC 3'), derivado da sequência listeriolisina e os *primers* iniciadores LL5 (5'AACCTATCCAGGT 3'GCTC) e LL6 (5'CTGTAAGCCATTTTCGTC 3'), que são específicos para *L. monocytogenes* (HERMAN; BLOCK; MOERMANS, 1995). As reações foram preparadas com os seguintes reagentes e concentrações: 2,0 ng de DNA de cada amostra; 5,0 X de tampão da enzima Taq DNA polimerase; 7,0 mM de MgCl₂; 1,5 pmol/ μ L de dNTPs; 1,5 pmol/ μ L de cada primer; 0,4 U de Taq DNA polimerase, com volume final ajustado para 50 μ L com água ultra pura. Incluiu-se o controle negativo, substituindo o DNA por água ultra pura. Os ciclos de ampliações foram realizados no Veriti Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems) sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 4 minutos, 39 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 56 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e extensão final de 72 °C por 10 minutos concluindo com o resfriamento por 8 °C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sobre luz ultravioleta. Em seguida, os amplicons foram purificados utilizando o kit Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences). Posteriormente foi realizada a identificação nucleotídica utilizando o sequenciador automático ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. A edição e montagem das sequências foi realizada com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation). A identidade taxonômica dos isolados foi verificada no banco de dados GenBank, utilizando o BLASTn “basic local alignment search tool” (BLAST) do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Resultados

Foram isoladas 24 cepas do gênero *Listeria* spp. em 26,66% (08) das amostras analisadas. As amostras contaminadas se encontravam em 50% dos boxes, sendo que destes, 30% apresentou contaminação em mais de uma amostra (Tabela 1).

Tabela 1: Número de amostras de carne bovina in natura contaminadas com *Listeria* spp por boxes de comercialização na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil.

	Boxes Avaliados									
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
N de Amostras contaminadas	2	0	0	0	0	1	2	0	2	1
Amostras contaminadas (%)	66,6	0	0	0	0	33,3	66,6	0	66,6	33,3

B = Boxes

N = número

Das cepas isoladas, três nas amostras do boxe um (B1), uma na amostra do boxe seis (B6), duas nas amostras do boxe sete (B7), cinco nas amostras do boxe nove (B9) e duas na amostra do boxe 10 (B10), totalizaram 13 cepas que foram confirmadas como *L. monocytogenes* tanto usando os testes bioquímicos quanto a PCR e o sequenciamento genético (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos isolados de *Listeria monocytogenes* coletados em amostras de carne bovina in natura comercializadas na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia, Brasil.

Isolado	Tamanho do amplicon ¹	Cobertura	Identidade ²	Taxonomia	Nº de acesso ³
A1	242	82%	98%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP012021.1
A2	466	98%	97%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP012021.1
A3	231	96%	99%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP012021.1
A4	395	85%	99%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP012021.1
A5	242	92%	98%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP012021.1
A6	236	95%	98%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP007686.1
A7	674	98%	98%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP010346.1
A8	866	98%	98%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP009897.1
A9	231	99%	98%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP011398.1
A10	773	99%	97%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP007600.1
A11	230	98%	98%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP011004.1
A12	130	99%	96%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP007210.1
A13	548	96%	97%	<i>Listeria monocytogenes</i>	CP006600.1

¹Os amplicons foram sequenciados em ambas as orientações e os fragmentos de consulta apresentados correspondem à sequência obtida. ²e-values "eram iguais a zero para os isolados. ³Os números de acesso que correspondem às sequências descritivas da taxonomia indicada na coluna anterior.

Discussão

A contaminação por *L. monocytogenes* em carne bovina ocorre em virtude do controle higienicossanitário inadequado durante o processamento ou a comercialização (Brasil, 2010), visto que esta bactéria é encontrada na natureza e no trato intestinal dos animais, favorecendo a contaminação da carcaça e cortes de carne (Mantilla *et al.*, 2007). Nesse sentido, provavelmente a presença de *L. monocytogenes* nas amostras de carne bovina estudada se deve ao local de comercialização, uma vez que a feira livre do município de Jiquiriçá apresenta precárias condições higienicossanitárias e de infraestrutura, situação não diferente das feiras livres encontradas no país (Beiró e Silva, 2009; Barros e Violante, 2014).

O Brasil não estabelece limites legais para o número permitido de *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos. Mas, considerando o regulamento 1441/2007, da Comunidade Europeia que estabelece tolerância zero para *L. monocytogenes* em 1g de carne (Codex Alimentarius International, 2007), as amostras analisadas no presente estudo, que apresentaram contaminação por esse microrganismo, estão impróprias para o consumo humano.

Possivelmente a legislação brasileira não define parâmetros para contaminação de *L. monocytogenes* em carnes e produtos cárneos por considerar que essa bactéria é termolábil e que esses alimentos passam por tratamento térmico antes de serem consumidos. Porém, o risco de listeriose está no consumo de carnes e produtos cárneos mal cozidos, principalmente se forem consumidos por pessoas pertencentes ao grupo de risco (Sergelidis e Abrahim, 2009). Sendo assim, é necessário que a legislação brasileira defina parâmetros legais de contaminação dessa bactéria para carne bovina, uma vez que a listeriose é uma doença de grande interesse para saúde pública, por apresentar alta taxa de letalidade (Andrade *et al.*, 2014).

Um aspecto importante que favorece a contaminação de alimentos por *L. monocytogenes* está relacionado à sua capacidade de formação de biofilme e de biotransferência, tanto em alimentos como em outras superfícies não nutritivas, que confere adesão e proteção ao microrganismo (Oliveira *et al.*, 2010). Esses biofilmes são capazes de permanecer meses, ou até anos, no ambiente o que possibilita a ocorrência de contaminações recorrente nos gêneros alimentícios (Markkula *et al.*, 2005).

A resistência do patógeno *L. monocytogenes* a tratamentos de desinfecção e a sucessivos congelamentos e descongelamentos, favorece a permanência dessa bactéria em

locais de manipulação e armazenamento de alimentos. Além disso, *L. monocytogenes* apresentam características que permitem sua multiplicação no alimento sob condições usualmente adversas para outras bactérias patogênicas, como ambientes ácidos, refrigerados ou com altos teores de cloreto de sódio (Oliveira *et al.*, 2010). A exposição a essas situações de estresse, e a composição de alimentos a base de carne, potencializa a expressão do gene de virulência listeriolisina nessa bactéria (Olesen *et al.*, 2010) o que aumenta os riscos de listeriose.

Os resultados indicam que os testes bioquímicos realizados neste trabalho foram tão eficazes para identificação de *L. monocytogenes*, quanto a análise molecular utilizando os genes LM1 (5'CCTAAGACGCCAATCGAA 3') e LM2 (5'AAGCGCTTGCAACTGCTC 3'), derivado da sequência listeriolisina e os *primers* iniciadores LL5 (5'AACCTATCCAGGT 3'GCTC) e LL6 (5'CTGTAAGCCATTTTCGTC 3') que são específicos para *L. monocytogenes*.

Um dos problemas para pesquisa de *L. monocytogenes* pelo método tradicional é a demanda de tempo, uma vez que a análise microbiológica convencional dessa bactéria pode demorar até 14 dias para a sua conclusão, enquanto que o ensaio de PCR é realizado em menos de 24 horas (Monteiro, 2015). Nesse sentido, a PCR é uma ótima alternativa para pesquisa de *L. monocytogenes* em alimentos, pois a detecção precoce de alimentos contaminados é fundamental para evitar surtos de origem alimentar (Gasanov; Hughes e Hansbro, 2005). Além disso, testes rápidos como a PCR favorecem a indústria exportadora de alimentos que tem interesse em liberar os produtos no mercado o quanto antes, a fim de reduzir os riscos de deterioração dos alimentos antes da comercialização, principalmente quando esses gêneros alimentícios são altamente perecíveis, que é o caso da carne bovina *in natura*. Apesar da legislação brasileira não definir parâmetro para a contagem de *L. monocytogenes* na carne bovina *in natura*, o Brasil exporta esse produto para diversos países que determinam ausência de *L. monocytogenes* em 1g ou em 25g do alimento, por isso é importante ter testes rápidos com alta sensibilidade para comprovação da qualidade da carne e, conseqüentemente, maior agilidade na exportação do produto (ABIEC, 2015).

A técnica da PCR é altamente sensível, rápida e viável economicamente para detectar *L. monocytogenes*, podendo ser empregada em atividades de monitoramento de *L. monocytogenes* num plano de Análise de Perigo e Pontos Críticos de Controle (HACCP) para o monitoramento da qualidade dos produtos alimentícios (Santos *et al.*, 2006).

Conclusão

A carne bovina comercializada na feira livre de Jiquiriçá - Bahia oferece risco biológico à saúde dos consumidores e precisa de uma maior atenção das autoridades de vigilância sanitária local em virtude da presença do patógeno *L. monocytogenes*.

A técnica de PCR apresentou o mesmo resultado que o método convencional para identificação *L. monocytogenes*, sendo que os resultados obtidos com a PCR demandam menos tempo.

Referências

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne – ABIEC (2015). Acesso em: <http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=1327#.VpOtg6uAGfs> Acesso em 29 de ago. 2015.

Almeida RB, Diniz WJS, Silva PTV, Andrade LP, Diniz WPS, Leal JBG, Brandespim DF (2011) Condições higiênico-sanitárias da comercialização de carnes em feiras livres de Paratama, PE. *Alimentos e Nutrição* 22: 585-592.

Andrade RR, Silva PHC, Souza NR, Murata LS, Gonçalves VSP, Santana AP (2014) Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo *hot dog* a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. *Ciência Rural* 44: 147-152.

Barros LSS, Violante PC (2014) Microbiologia da carne bovina “in natura” comercializada nas feiras livres do recôncavo baiano. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 08: 185-197.

Beiró CFF, Silva MC (2009) Análise das condições de higiene na comercialização de alimentos em uma feira livre do Distrito Federal. *Universitas: Ciências da Saúde* 7: 13-28.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. (2010) Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf. Acesso em 17 de abril de 2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de informações hospitalares. (2009). Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/area/11/biblioteca.html>. Acesso em 12 de agosto de 2015.

Center for Food Safety and Applied Nutrition - CFSAN (2009). “Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook” 2ªEd, U.S. Food and Drug Administration (FDA). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>. Acesso em 16 de julho 2014.

Cheng Q, Sun D-W (2008) Factors Affecting the Water Holding Capacity of Red Meat Products: A Review of Recent Research Advances. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 137-159.

Codex alimentarius international food standards. Guidelines on the Application of General Principles of Food Hygiene to the Control of *Listeria Monocytogenes* in Foods. CAC/GL 61/2007. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net>. Acesso em 12 de novembro de 2014.

Fox E, Hunt K, O'brien, Jordan K (2011) *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments, *International Journal of Food Microbiology* 145: 539-545.

Gandhi M, Chikindas ML (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113: 1-15.

Gandra, EA, Gandra TKV, Mello WS, Godoi, HS (2008) Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Scientiarum Technology, Maringá* 30:109-118.

Gasanov, U, Hughes, D, Hansbro, PM (2005) Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews* 29:851–875.

Herman LM, De Block JH, Moermans RJ (1995) Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with nested primers. *Appl Environ Microbiol* 61:817–819.

Liu D (2006) Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology* 55: 645-659.

Mantilla SPS (2007) Importance of *Listeria monocytogenes* on foods from animal origin. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia* 14: 180-192.

Markkula A, Autio T, Lundén J, Korkeala H (2005) Raw and processed fish show identical *Listeria monocytogenes* genotypes with pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Food Protection* 68: 1228-1231.

Monteiro FC (2015) Avaliação de *Listeria monocytogenes* como controle de qualidade no processamento de carnes. Ponta Grossa, Brasil, 101 p. (Dissertação. Engenharia de produção. Universidade Tecnológica Federal do Paraná).

NCBI Reference Sequence Database. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Acesso em 29 de ago. 2015.

Olesen I, Torsen L, Jespersen L (2010) Relative transcription of *Listeria monocytogenes* virulence genes in liver pâtés with varying NaCl content. *International Journal of Food Microbiology* 141:560-568.

Oliveira JD, Silva TRS, Correia MGS (2013) Fatores Determinantes da Qualidade Nutricional da Carne Bovina. *Cadernos de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde* 1: 37-46.

Oliveira MM, Brugnera DF, Alves E, Piccoli RP (2010) Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 97-106.

Pal A, Labuza TP, Diez-Gonzalez F (2008) Shelf life evaluation for ready-to-eat sliced uncured turkey breast and cured ham under probable storage conditions based on *Listeria monocytogenes* and psychrotroph growth. *International Journal Food Microbiol* 126:49-56.

Parihar VS, Lopez-Valladares G, Danielsson-Tham ML, Peiris I, Helmersson S, Unemo M, Andersson B, Arneborn M, Bannerman E, Barbuddhe S, Bille J, Hajdu L, Jacquet

C, Johansson C, Löfdahl M, Möllerberg G, Ringberg H, Rocourt J, Tjernberg I, Ursing J, Henriques-Normark B, Tham W (2008) Characterization of human invasive isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986-2007. *Journal of Foodborne Pathogens and Disease* 5: 755-761.

Rubin L, Waquil P (2013) Estrutura exportadora do agronegócio e impactos socioeconômicos para os países do cone sul. *Revista de Economia e Sociologia Rural* 51: 137-160.

Santos LAG, Pinto PSA, Moraes MP, Vanetti MCD, Bevilacqua PD, Pinto MS, Dias FS (2006) Pesquisa molecular e convencional de *Listeria monocytogenes* para o controle de qualidade da carne suína. *Ceres* 53:481-486.

Sergelidis D, Abraham A (2009) Adaptive Response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control* 20: 1-10.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR (2010) Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4. ed. São Paulo: Varela, 624.

Uchima CA, Castro MFPM, Gallo C R, Rezende ACB, Benato ER, Penteadó AL (2008) Incidence and growth of *Listeria monocytogenes* in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. *International Journal of Food Microbiology* 126: 235-239.

Warriner K, Namvar A (2009) What is the hysteria with *Listeria*? *Food Science and Technology* 20: 245-254.

Zhu L (2012) Prevalence and Serotype of *Listeria monocytogenes* contamination in chinese beef processing plants. *Foodborne Pathogens and Disease* 9: 556-560.

CAPÍTULO 4

EFEITO ANTIBACTERIANO DE QUITOSANA NO CONTROLE DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM CARNE BOVINA

MANUSCRITO A SER SUBMETIDO AO BOLETIM DO CENTRO DE PESQUISA
DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

Efeito Antibacteriano de Quitosana no Controle de Bactérias Patogênicas em Carne Bovina

Alessandra Santana Silva*
Norma Suely Evangelista-Barreto**
Fábio Marcel da Silva Santos***
Adriana Pereira Sampaio*
Bartolomeu Warlene Silva de Souza****

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo testar o efeito antimicrobiano da quitosana na redução da carga microbiana de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus* em bifés de carne bovina. A partir da realização de testes antimicrobianos in vitro, utilizando filmes de quitosana nas concentrações de 1%, 1,5% e 2%, observou-se que o filme que apresentou maior capacidade inibitória, frente às cepas bacterianas testadas, foi o filme com concentração de 2% de quitosana. Os bifés de carne bovina tratados com solução de quitosana a 2% apresentaram redução altamente significativa ($p < 0,01$) da carga microbiana para todas as bactérias patogênicas testadas (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*), quando comparadas com os controles. A partir desses resultados foi possível concluir que revestimentos de quitosana podem ser utilizados no controle da qualidade microbiológica de carne bovina in natura, sendo a concentração de 2% de quitosana a mais recomendada.

PALAVRAS-CHAVE: ANTIMICROBIANO NATURAL; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella*; *Staphylococcus*.

1 INTRODUÇÃO

A carne bovina apresenta nutrientes que desempenham importantes funções em nosso organismo como vitaminas e aminoácidos essenciais, sendo considerada fonte de proteína de alto valor biológico (OLIVEIRA, SILVA e CORREIA, 2013). No entanto, as características intrínsecas da carne como

elevada atividade de água, nutrientes e pH, favorecem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos que podem ser transmitidos à população (ALCÂNTARA, GATTO e KOZUSNY-ANDREANI, 2012).

As doenças de origem alimentar são causadas por diversos microrganismos (FLORES e MELO, 2015). Dentre eles, destacam-se as bactérias que causam preocupação em relação às carnes, tais como a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, por serem patogênicas e estarem relacionadas às infecções e toxinfecções em surtos envolvendo esse gênero alimentício (MOURA *et al.*, 2007).

A maioria dos casos de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) não são notificadas pelo fato dos indivíduos apresentarem sintomas brandos e, por essa razão, não buscarem auxílio médico. Apesar dessa subnotificação, no período de 2000 a 2013, a região Sudeste notificou 39,8% dos casos de DVAs no Brasil, seguido da região Sul com 38,9% e da região Nordeste com 11,9%. A região Norte apresenta o menor percentual, com apenas 3,5% dos casos notificados no país. Nesse período, a carne bovina foi o quinto alimento mais envolvido em surtos alimentares no Brasil, sendo responsável por 345 casos (SINAN, 2013).

Nos últimos anos, a crescente exigência do consumidor por alimentos seguros, ou seja, alimentos microbiologicamente seguros, sem a adição de aditivos químicos e que mantenham a qualidade nutritiva e sensorial do produto, tem impulsionado a busca por substâncias naturais com características antimicrobianas capazes de controlar a proliferação microbiana nos alimentos (FAI, STAMFORD e STAMFORD, 2008). Nesse contexto, a atividade antimicrobiana da quitosana vem sendo estudada e discutida com o intuito de utilizá-la como biomaterial antimicrobiano (QIUPING e WENSHUI, 2007; ALBUQUERQUE *et al.*, 2009).

A quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação parcial da quitina (AIROLDI, 2008; BADAUWY *et al.*, 2009). A quitina é um biopolímero atóxico e biodegradável, amplamente distribuído na natureza, encontrado principalmente em exoesqueletos de crustáceos e na parede celular de alguns fungos (KUNIYOSHI, 2012).

Nos últimos anos, tem-se desenvolvido estudos com a quitosana a fim de testar o seu potencial de aplicação como bioconservador em alimentos, por esta apresentar atividade antimicrobiana *in vitro* (LIU *et al.*, 2006; RAMÍREZ *et al.*, 2011). Além disso, a quitosana tem sido utilizada como revestimento comestível de produtos minimamente processados (BOTREL *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2011), files de pescado (FERNÁNDEZ-SAIZ *et al.*, 2013) e aplicada no tratamento pós-colheita de frutas (CHONG, LAI e YANG, 2014), hortaliças (SANTOS, 2008) e raízes (BUSO *et al.*, 2014).

Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo testar o efeito antimicrobiano da quitosana na redução da carga microbiana de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* e *S. aureus* em bifes de carne bovina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, e os filmes de quitosana utilizados no experimento foram elaborados no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, em Fortaleza - CE.

2.1 FILMES DE QUITOSANA

Para o preparo dos filmes utilizou-se quitosana de alto peso molecular, com grau de desacetilação de 90%, obtida da POLYMAR Indústria e Comércio LTDA. Diferentes concentrações de quitosana (0,0%; 1,0%; 1,5%; 2,0%), foram diluídas em solução de ácido láctico a 1% (v/v) acrescido de glicerol a 0,2% (v / v), sob agitação por 4 horas. Após esse período, os filmes foram preparados utilizando a técnica de evaporação do solvente (JONES e MEDLICOTT, 1995). Para tanto, as soluções de quitosana foram dispersas em placas de Petri, para as quais se transferiu um volume de 35mL de solução que foram secas em estufa com circulação de ar por 24 horas em temperatura de 40°C.

2.2 TESTE ANTIMICROBIANO DE QUITOSANA IN VITRO

Foi realizado o teste de difusão em disco usando filmes de 6 mm de diâmetro de quitosana (KARAMAN *et al.*, 2003). Após crescimento *over night* um inoculo contendo 6 log UFC/mL de cada patógeno (*E. coli* ATCC 25922, *L.*

monocytogenes, *S. enterica* e *S. aureus* ATCC 6538) foi espalhado em placas de Petri contendo ágar Muller-Hinton e incubadas a 37°C por 24 horas. Os halos de inibição foram medidos com paquímetro (Digimess®) e expressos em milímetros. Os testes foram realizados em triplicata.

2.3 EFEITO ANTIMICROBIANO DE QUITOSANA EM BIFE DE CARNE BOVINA

Cortes de carne bovina foram adquiridos no comércio local e transportados em recipientes isotérmicos até o LABMAA da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em Cruz das Almas – BA, onde foram separados em quatro grupos de acordo com o microrganismo teste (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* e *S. aureus*). Em cada grupo, cada corte de carne bovina foi subdividido em 22 bifos, pesando em média 100 g. Duas unidades foram submetidas à análise microbiológica para verificar a carga microbiana inicial. As demais unidades foram contaminadas intencionalmente, com suspensão bacteriana de 6 log UFC/mL para o microrganismo indicador. Após 30 minutos, 10 unidades foram submetidas ao tratamento com solução de revestimento de quitosana que consistiu em imergir os bifos em 500 mL de solução de quitosana a 2% por 10 segundos. As demais unidades (controle) foram imersas em água destilada estéril também por 10 segundos. Todas as amostras foram mantidas em refrigeração a 4°C por 72 horas.

Após esse período foram realizadas as análises microbiológicas tanto do grupo teste quanto do grupo controle para verificar a carga microbiana dos patógenos. Para tanto, utilizou-se técnicas padrões de contagens microbiológicas descritas por SILVA *et al.* (2010) no Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a significância estatística utilizou-se a análise de variância e teste de Tukey para avaliar todos os resultados e regressão apenas para avaliar as diferentes concentrações de quitosana testadas. O software utilizado foi o SISVAR, versão 4.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 o filme de quitosana que apresentou maior capacidade inibitória in vitro, frente aos patógenos testados, foi o de maior concentração (2%). A diferença estatística entre as concentrações de quitosana a 1,0, 1,5 e 2,0% foi altamente significativa ($p < 0,01$). Estes resultados corroboram com os dados de Cardoso e Ramos (2011), ao citarem que concentrações de 1,5% de quitosana apresentam maiores halos de inibição quando comparada à concentração de 1,0% de quitosana, tanto para bactérias Gram-positivas quanto para as Gram-negativas.

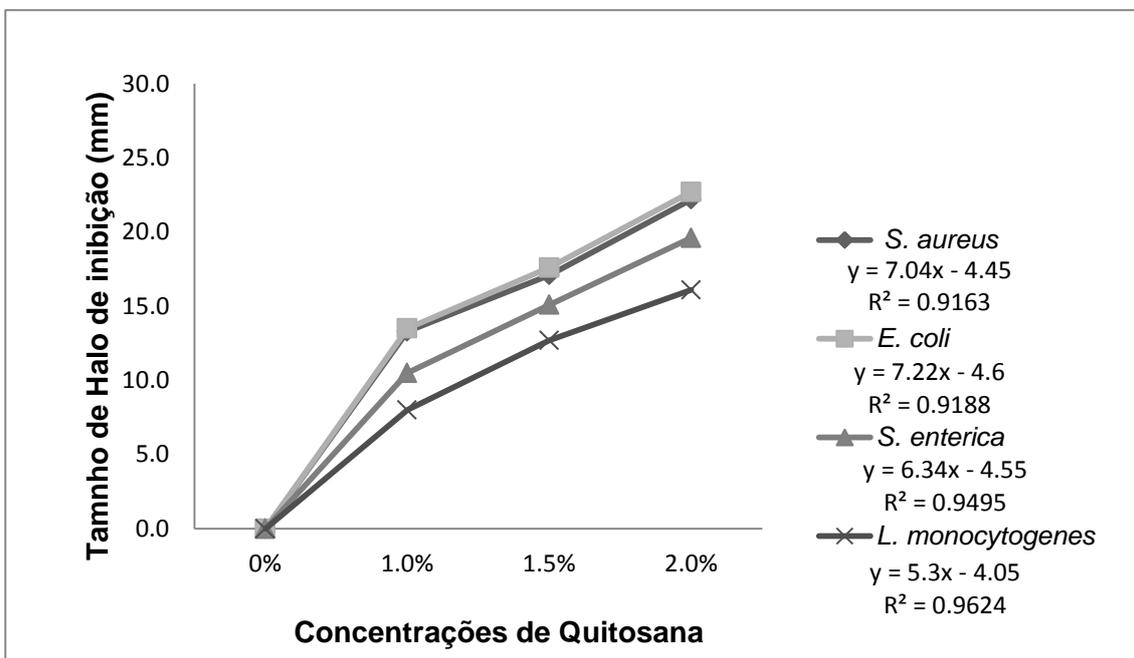


FIGURA 1 – CURVAS DA ANÁLISE DE REGRESSÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA TESTADA IN VITRO FRENTE ÀS CEPAS BACTERIANAS.

A diferença de tamanho dos halos de inibição entre as cepas bacterianas testadas não foi estatisticamente significativa a 5% de probabilidade. No entanto, como pode ser observado na Figura 1 a quitosana apresentou menor poder inibitório frente à *L. monocytogenes* in vitro, quando comparado aos outros microrganismos testados. Isso pode estar relacionado à genética dessa bactéria que a torna resistente a condições adversas como ambientes ácidos, refrigerados ou com altos teores de cloreto de sódio (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Lemaître *et al.* (1998) estudaram a múltipla resistência de *L. monocytogenes* a agentes

antimicrobianos e observaram que todas as cepas resistentes dessas bactérias apresentavam DNA extracromossomal e verificaram que havia troca de plasmídios entre as cepas com muita frequência.

Como pode ser observada na Figura 1, a equação da regressão que avalia as diferentes concentrações de quitosana testadas é linear, mostrando a necessidade de estudos que testem o efeito antimicrobiano de concentrações maiores de quitosana a fim de definir uma concentração ótima. Pois, no presente estudo isso não foi viável, uma vez que concentrações acima de 2,0% de quitosana aumentam a viscosidade da solução inviabilizando sua utilização como revestimento comestível em bifes de carne bovina por alterar a aparência característica desse gênero alimentício.

As análises microbiológicas iniciais dos cortes de carne bovina, utilizados no experimento não apresentaram contaminação pelos microrganismos pesquisados (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp e *Staphylococcus* coagulase positiva). Estando, portanto, dentro dos parâmetros microbiológicos estabelecido na RDC nº12 (BRASIL, 2001).

Os bifes de carne bovina tratados com solução de quitosana a 2% apresentaram redução de 6 ciclos logarítmicos da carga microbiana para todas as bactérias patogênicas testadas quando comparadas com os controles (Tabela 1). Dessa forma, a utilização do revestimento de quitosana na indústria de alimentos de origem animal é promissora, pois reduz significativamente ($p < 0,01$) bactérias patogênicas envolvidas em surtos alimentares (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* e *S. aureus*).

TABELA 1. REDUÇÃO DA CARGA MICROBIANA MÉDIA DA CARNE BOVINA REVESTIDA COM SOLUÇÃO DE QUITOSANA A 2% POR 72 HORAS A 4°C.

Tratamentos	Microrganismos (log UFC/g)			
	<i>E.coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enterica</i>	<i>S. aureus</i>
Sem quitosana	6,91 ^b	5,99 ^b	6,39 ^b	6,69 ^b
Com quitosana	0,04 ^a	0,10 ^a	0,10 ^a	0,06 ^a

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Médias seguidas por letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste F a 1% de probabilidade.

Um dos fatores que pode ter contribuído para esses resultados foi o elevado grau de desacetilação (90%) da quitosana usada, pois a atividade antibacteriana da quitosana pode variar de acordo com o grau de desacetilação, ou seja, a atividade antibacteriana aumenta à medida que o grau de desacetilação é maior (SHIH-BIN *et al.*, 2009).

Embora o exato mecanismo de ação da quitosana como agente antimicrobiano ainda seja desconhecido, alguns autores sugerem que a estrutura policatiônica da quitosana estabelece interações eletrostáticas com os componentes aniônicos da superfície dos microrganismos, alterando a permeabilidade celular e inibindo o transporte de nutrientes através da membrana plasmática dos microrganismos (TAO, QIAN e XIE, 2011; SAJOMSANG *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2013).

Em filés de tilápia, o revestimento de quitosana a 0,5% reduziu o crescimento de microrganismos psicotróficos e a oxidação lipídica, aumentando a vida de prateleira e melhorando a qualidade do alimento final (SANTOS *et al.*, 2014). Shekarforoush (2015), analisando o efeito antimicrobiano da quitosana em carne de frango curada, também observaram que a concentração de 2% de quitosana foi eficaz na redução da carga de *L. monocytogenes* no alimento. Por outro lado, filmes de quitosana não apresentaram atividade bactericida contra *L. monocytogenes* inoculadas em salmão fumado, possivelmente pela dificuldade dos filmes de quitosana se difundirem através da matriz do produto alimentício (YE, NEETOO e CHEN, 2008). Nesse sentido, a solução de revestimento de quitosana pode ser mais eficiente quando comparada ao filme de quitosana.

A quitosana também pode ser usada como um valioso e seguro coadjuvante no controle da dislipidemia, uma vez que reduz a absorção do colesterol na dieta (BESSA-JUNIOR e GONÇALVES, 2013). Considerando que a carne bovina é, dentre os gêneros alimentícios, uma das principais fontes de colesterol (SANTOS *et al.*, 2013), apresentando cerca de 59 mg de colesterol por 100 g de carne (HAUTRIVE, MARQUES e KUBOTA, 2012), o uso do revestimento de quitosana além de atuar no controle microbiológico desse produto pode inibir a absorção do colesterol presente nesse gênero alimentício.

Outra vantagem no uso da quitosana como antimicrobiano natural em alimentos é o fato deste polímero não alterar as características organolépticas do

produto, mantendo, o aroma e o sabor característico dos alimentos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). Além disso, a coloração vermelha e brilhante natural e ideal da carne bovina (OLIVEIRA; SILVA; CORREIA, 2013) é intensificada. Esta característica, também observada no presente estudo, foi analisada por Cardoso e Ramos (2011) e eles concluíram que a quitosana favorece a manutenção da cor de carnes bovinas durante os dias de estocagem por reduzir a oxidação do pigmento de O₂Mb a MMb, durante o armazenamento. Essa característica favorece ainda mais o uso da quitosana como conservante natural de carnes e produtos cárneos em substituição a conservantes químicos como o nitrito que, apesar de ser eficiente na conservação e preservação/intensificação da cor desse alimento, é tóxico, pois a nitração das aminas formando nitrosaminas secundárias é um dos fatores que aumentam a incidência de câncer no homem (OLIVEIRA, ARAÚJO e BORGIO, 2005).

Nesse sentido, a utilização do revestimento de quitosana em bifés de carne bovina também traria benefícios para o comércio do produto, uma vez que os aspectos importantes na comercialização desse gênero alimentício são as características físicas e sensoriais, por estarem associadas com a aceitação e satisfação do consumidor no momento da compra (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

5 CONCLUSÃO

A eficiência do revestimento de quitosana na redução de patógenos (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enterica* e *S. aureus*) de importância para a indústria alimentícia permite que a mesma seja utilizada no controle da qualidade microbiológica de carne bovina in natura, sendo a concentração de 2% de quitosana a mais eficiente na faixa estudada.

ABSTRACT

Antibacterial Effect of Chitosan on Pathogenic Bacteria Control in Beef

This study aimed to test the antimicrobial effect of chitosan in reducing microbial load *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* in beef steaks. From antimicrobial testing of conducting in vitro using chitosan films at concentrations of 1%, 1.5% and 2%, it was observed that the film that had the highest inhibitory capacity, compared to the tested bacterial strains was the film with concentration of 2% chitosan. The beef steaks

treated with 2% chitosan solution showed a significant reduction of the microbial load for all the tested pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*) when compared with controls. From these results it was concluded that chitosan coatings can be used to control microbiological quality of fresh beef, with a concentration of 2% chitosan the most recommended.

KEYWORDS: NATURAL ANTIMICROBIAL; *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella*; *Staphylococcus*.

REFERÊNCIAS

AIROLDI, C. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. **Química Nova**, v.31 p.144-153, 2008.

ALBUQUERQUE, R.B.; SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; STAMFORD, T.C.M. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.10, n.5, 2009.

ALCÂNTARA, M.A.; GATTO, I.R.H.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Ocorrência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de cortes de carne bovina. **Veterinária em Foco**, v.10, n.1, jul./dez. 2012.

BADAWY, M.E.I.; RABEA, E.I. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology Technology**, v. 51, n.1, p.110-117, jan. 2009.

BESSA-JUNIOR, A.P.; GONÇALVES, A.A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. **Actapesca**, v.1, n.1, p.13-28, 2013.

BOTREL, D.A.; SOARES, N.F.F.; GERALDINE, R.M.; PEREIRA, R.M.; FONTES, E.A.F. Quality of minimally processed garlic (*Allium sativum*) coated with antimicrobial edible coating. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1. p. 32-38, jan./mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução RDC nº 12, de 12 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. 12 de jan. 2001.

BUSO, E.K.R.P.M.; CLEMENTE, E.; ESTRADA, K.R.F.S.; ZÁRATE, N.A.H.; OLIVEIRA, J.S. B. Comportamento pós-colheita de mandioquinha-salsa revestida com Quitosana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 45, n. 4, p. 850-855, out-dez, 2014.

CARDOSO, G.P. **Revestimentos comestíveis à base de gelatina, glicerina, quitosana e óleos essenciais para conservação de carne bovina refrigerada.** 2011. Dissertação (Mestrado ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CHONG, J.X.; LAI, S.; YANG, H. Chitosan combined with calcium chloride impacts fresh-cut honeydew melon by stabilising nanostructures of sodium-carbonate-soluble pectin. **Food Control**, v.53, p. 195 – 205, jul. 2015.

Fernández-Saiz, P; Sánchez, G.; Soler, C.; Lagaron, J.M.; Ocio, M.J. Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets. **Food Control**. n. 34, p. 61-68, 2013.

FLORES, A.M.P.C.; MELO, C.B. Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar. **Revista Brasileira Medicina Veterinária**, v. 37, n.1, p.65-72, jan./mar. 2015.

HAUTRIVE, T.P.; MARQUES, A.C.; KUBOTA, E.H. Composição centesimal da carne de avestruz. **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 327-334, abr./jun. 2012.

JARMILA, V.; VAVRÍKOVÁ, E. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities-a review. **Current Pharmaceutical Design**, v.17, n.32, p.3596-3607, 2011.

JONES, D.S.; MEDLICOTT, N.J. Casting solvent controlled release of chlorhexidine from ethylcellulose films prepared by solvent evaporation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.114, p.257-26, 1995.

KUNIYOSHI, J.N. La Quitosana. **Revista de Química PUCP**, vol.26, n.1-2, 2012.

LEMAÎTRE, J.P.; ECHCHANNAOUI H.; MICHAUT G.; DIVIES C.; ROUSSET A. Plasmid-Mediated resistance to Antimicrobial Agents among *Listeriae*. **Journal of Food Protection**. v.61, n.11, p.1.459-1.464, nov. 1998.

LIU, N.; CHEN, X.; PARK, H.; LIU, C.; LIU, C.; MENG, X.; YU, L. Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*. **Carbohydrate Polymers**, v.64. p.60-65, abr. 2006.

MOURA, A.P.B.L.; PINHEIRO, J.J.W.; OLIVEIRA, R.B.A.; DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; REIS, M.F. Pesquisa de coliformes termotolerantes, totais e *Salmonella* spp. Em carnes caprinas comercializadas na cidade do Recife, Pernambuco. **Arquivos do instituto biológico**, São Paulo, v.74, n.4, p.293-99, out./ dez. 2007.

OLIVEIRA, A.V.B.; SILVA, R.A.; ARAÚJO, A.S.; BRANDÃO, P.A.; COSTA, F.B. Padrões Microbiológicos da Carne de Frango de Corte. Referencial Teórico. **Revista Verde**, Mossoró, v.6, n.3, jul./set. 2011.

OLIVEIRA, J.D.; SILVA, T.R.S.; CORREIA, M.G.S. Fatores Determinantes da Qualidade Nutricional da Carne Bovina. **Cadernos de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v.1, n.16, p.37- 46, mar. 2013.

OLIVEIRA, M.J.; ARAÚJO, W.M.C.; BORGIO, L.A. Riscos químicos em lingüiça do tipo frescal: aspectos teóricos / Chemical risks in sausage of the frescal: theoretical aspects. **Higienistas de Alimentos**, v.19, n.130, p.24-29, abr. 2005.

OLIVEIRA, M.M.; BRUGNERA, D.F.; ALVES, E.; PICCOLI, R.P. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface and biotransfer potential. **Brazilian Journal of Microbiolog**, v. 4, p. 97-106, 2010.

QIUPING, Z.; WENSHUI, X. A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.74, p.127–132, 2007.

RAMÍREZ, C.C.; SALCIDO, N.M.F.; CANO, R.D.P.; ORTIZ-RODRÍGUEZ, T.; CORONA, J.E.B. Potencial de los quito-oligosacáridos generados de quitina y quitosana. **Acta Universitaria**, v.21, n.3, set./dez. 2011.

SAJOMSANG, W.; GONIL, P.; SAESOO, S.; OVATLARNPORN, C. Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.50, p.263-269, jan. 2012.

SANTOS, C.A.A.; CASTRO, J.V.; PICOLI, A.A.; ROLIM, G.S. Uso de quitosana e embalagem plástica na conservação pós-colheita de pêssegos 'Douradão'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.30, p.88-93, mar. 2008.

SANTOS, F.M.S.; NASCIMENTO, R.M.; SOUZA, B.W.S.; CUNHA, M.G.C.; BEZERRA, R.S. **Utilização de quitosana no revestimento de filés de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) e na preparação de filmes incorporados com óleos essenciais**. 2014. Tese (Doutorado em Bioquímica e Fisiologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SANTOS R.D.; GAGLIARDI A.C.M.; XAVIER H.T.; MAGNONI C.D.; CASSANI R.; LOTTENBERG A.M. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.100, p.1-40, 2013.

SEJAS, L.M.; SILBERT, S.; REIS, A.O.; SADER, H.S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.39, n.1, p.27-35, 2003.

SHIH-BIN, L.; SHAN HE, C.; KOU CHENG, P. Preparation of antibacterial chito-oligosaccharide by altering the degree of deacetylation of β -chitosan in a *Trichoderma harzianum* chitinase-hydrolysing process. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.89 p.238-244, 2009.

SHEKARFOROUSH, S.S.; BASIRI, S.; EBRAHIMNEJAD, H.; HOSSEINZADEH, S. Effect of chitosan on spoilage bacteria, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in cured chicken meat Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.76, p.303–309, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos, GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 edição. São Paulo: Livraria Varela, p. 614, 2010.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Coordenação Geral de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília, 2014. Disponível em: < <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em: 23 de julho de 2015.

SOARES, N.F.F.; SILVA, D.F.P.; CAMILLOTO, G.P.; OLIVEIRA, C.P.; PINHEIRO, N.M.; MEDEIROS, E.A.A. Uso de revestimento comestível e conservação pós-colheita de goiaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal , v. 33, n. 1, 2011.

TAN, H.; MA, R.; LIN, C.; LIU, Z.; TANG, T. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. **Internationsl Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1854-1869, Jan. 2013.

TAO, Y.; QIAN, L-H.; XIE, J. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p.969–974, 2011.

YE, M.; NEETOO, H.; CHEN, H. Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 260-268, 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente pesquisa evidenciou-se que a carne bovina in natura vendida na feira livre do município de Jiquiriçá, Bahia é comercializada em condições higienicossanitárias inadequadas, uma vez que em todos os pontos de venda o produto se encontrava exposto a diversas fontes de contaminação e era mantido em temperatura ambiente. Esses fatores contribuíram para a elevada contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e presença de *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* encontradas nas amostras de carne analisadas. Nesse sentido, a carne bovina comercializada na feira livre de Jiquiriçá precisa de uma maior atenção das autoridades de vigilância sanitária em virtude da presença desses patógenos.

Sugere-se que as autoridades sanitárias do Brasil editem normas que padronizem os limites aceitáveis para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e *L. monocytogenes* em carne bovina in natura, a fim de definir mais um parâmetro para avaliar se esse alimento está seguro para o consumo humano. Além disso, é importante que medidas de segurança higienicossanitárias para os estabelecimentos que comercializam alimentos em feiras livres sejam regulamentadas.

A atuação dos serviços de vigilância sanitária é indispensável para melhoria da qualidade dos gêneros alimentícios comercializados em feiras livres, não apenas com a utilização de medidas coercitivas e punitivas, mais sim com a inclusão de ações educativas capazes de convencer os manipuladores da importância das Boas Práticas de Manipulação na prevenção de Doenças Veiculadas por Alimentos.

O revestimento de bifes com solução de quitosana se mostrou eficiente na redução de patógenos de importância para a indústria alimentícia. Dessa forma, indica-se a utilização desse polímero no controle da qualidade microbiológica de carne bovina, sendo a concentração de 2% de quitosana a mais eficiente na faixa estudada.

É importante ressaltar a necessidade de estudos que realizem testes sensoriais para avaliar a aceitabilidade de bifes revestidos com biopolímeros de quitosana.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Lista de Verificação dos aspectos Higienicossanitários de Açougues Localizados em Feiras Livres

DATA: ____ / ____ / ____

A - IDENTIFICAÇÃO DO AÇOUGUE

1-Endereço _____

2 – Número de manipuladores: _____ Feminino, _____ Masculino

1 - EDIFICAÇÃO E INSTALAÇÕES	SIM	NÃO
1.1 Área interna livre de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente.		
1.2 PISO		
De material que permite fácil e apropriada higienização e em adequado estado de conservação (livre de defeitos, rachaduras, trincas, buracos e outros).		
Limpo e higienizado		
1.4 PAREDES E DIVISÓRIAS:		
Acabamento liso, impermeável e de fácil higienização. De cor clara.		
() Limpas () Em adequado estado de conservação.		
1.5 PORTAS, JANELAS E OUTRAS ABERTURAS		
() Limpas () Com superfície lisa, de fácil higienização.		
1.6 INSTALAÇÕES SANITÁRIAS		
Possui vasos sanitários; mictórios e lavatórios íntegros.		
Instalações sanitárias dotadas de torneira(s) servida(s) de água corrente e tratada.		
Pisos e paredes adequadas e apresentando satisfatório estado de conservação.		
1.10.9 Instalações sanitárias dotadas de produtos destinados à higiene pessoal: () papel higiênico, () sabonete líquido inodoro anti-séptico ou sabonete líquido inodoro e anti-séptico, () toalhas de papel não reciclado para as mãos ou outro sistema higiênico e seguro para secagem.		
Presença de lixeiras com tampas e com acionamento não manual.		
Apresentam-se organizados e limpos		
Instalações sanitárias dos manipuladores são separadas das dos feirantes/consumidores		
1.7 LAVATÓRIOS NA ÁREA DE PRODUÇÃO		
Existência de lavatórios dotados de torneira com água corrente		
Lavatórios em condições adequadas de higiene, dotados de sabonete líquido inodoro anti-séptico ou sabonete líquido inodoro e anti-séptico, toalhas de papel não reciclado ou outro sistema higiênico e seguro de secagem e coletor de papel acionados sem contato manual.		
Higienização das instalações adequada		
1.8 CONTROLE INTEGRADO DE VETORES E PRAGAS URBANAS:		
() Presença de vetores e pragas urbanas ou qualquer evidência de sua presença como fezes, ninhos e outros, () presença de animais		
() Existência de comprovante de dedetização executada por empresa especializada.		

1.9 ABASTECIMENTO DE ÁGUA:		
Sistema de abastecimento ligado à rede pública.		
Apropriada frequência de higienização do reservatório de água.		
1.10 MANEJO DOS RESÍDUOS		
Presença de lixeiras com () tampas e () acionamento não manual, () de fácil higienização, () limpas e com sacos de lixo apropriados.		
Retirada freqüente dos resíduos da área de processamento, evitando que o lixo derrame.		
Existência de área adequada para estocagem dos resíduos.		
1.11 EQUIPAMENTOS:		
Superfícies em contato com a carne limpas, lisas, íntegras, impermeáveis, de fácil higienização e de material não contaminante.		
Presença de refrigeradores com tampa de vidro para com capacidade para expor as carnes à mostra		
Refrigeradores e frízeres com termômetro localizado em local apropriado e em adequado funcionamento.		
Mesas e/ou bancada de material apropriado, resistentes, impermeáveis; em adequado estado de conservação, com superfícies íntegras.		
1.12 UTENSÍLIOS:		
() Limpos () Presença de utensílios de madeira		
1.13 MANIPULADORES		
Utilização de uniforme de trabalho de cor clara, adequado à atividade.		
Uniformes limpos e em adequado estado de conservação.		
Apresentam ferimentos/ lesões nas mãos.		
Asseio pessoal: () asseio corporal, () mãos limpas, () unhas limpas e curtas, () sem esmalte, () sem adornos, () manipuladores barbeados, () com os cabelos protegidos.		
Lavam as mãos antes da manipulação de alimentos.		
1.4 MANIPULAÇÃO DAS CARNES COMERCIALIZADAS		
A carne vendida é acondicionado em embalagens () adequadas e íntegras. Ou () inadequadas (sacolas de mercado, dentre outras).		
Os consumidores tocam na carne antes de comprar		
Presença de carnes exposta em temperatura ambiente		
O indivíduo que corta a carne é o mesmo que manipula o dinheiro.		
Manipuladores e consumidores utilizam panos de prato na secagem das mãos após tocar na carne		

APÊNDICE 2

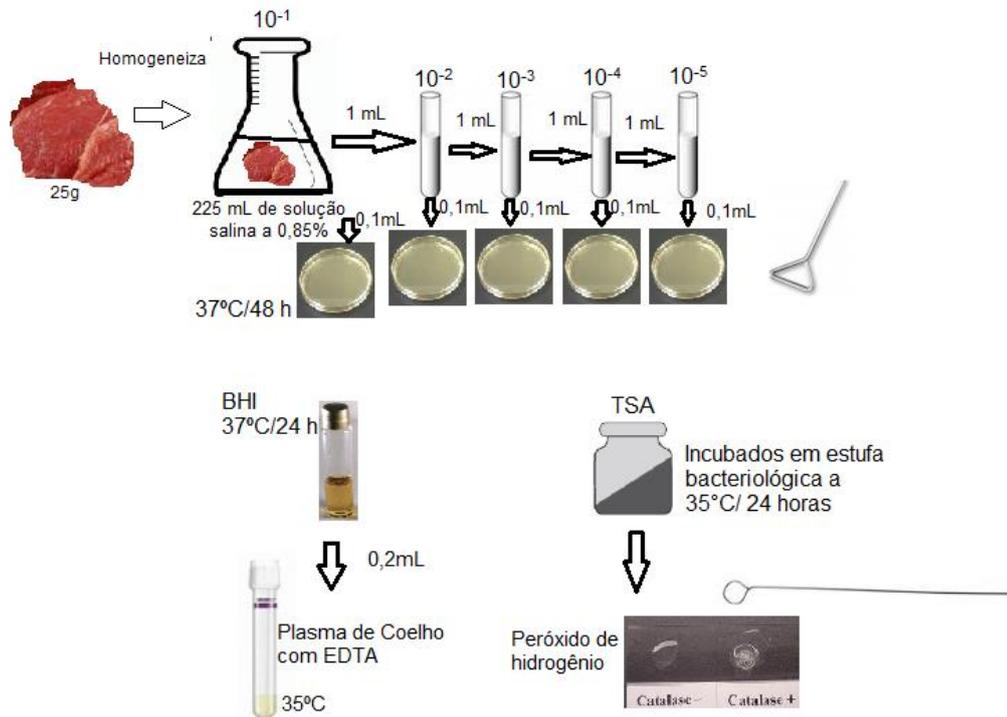


Figura 1- Pesquisa de *Staphylococcus coagulase* positiva.

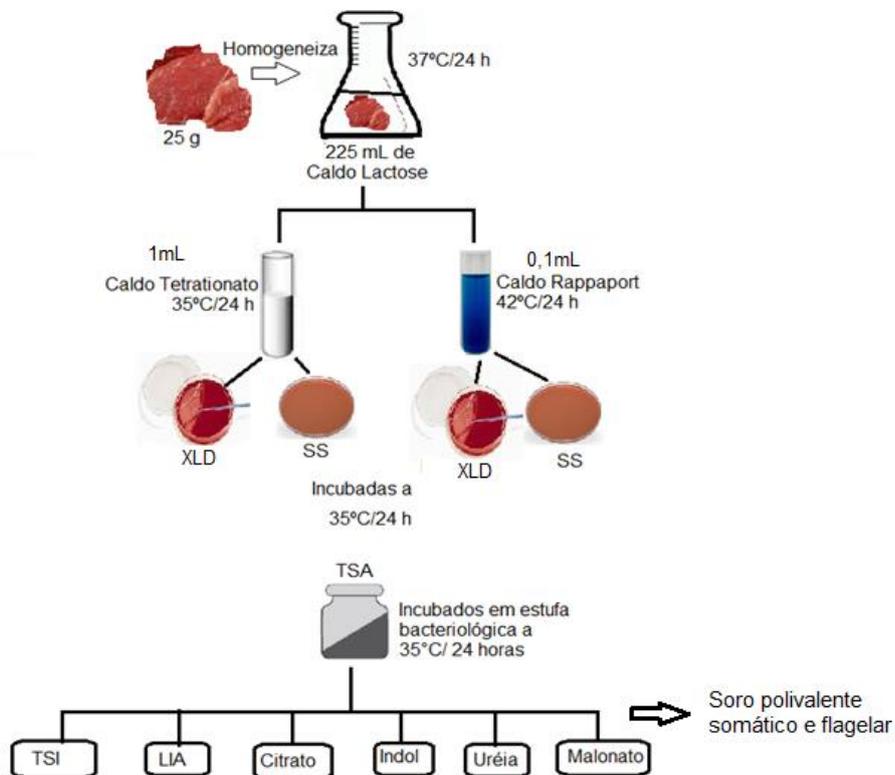
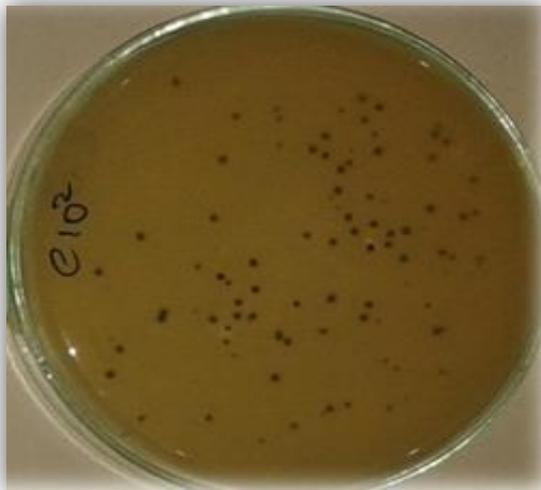


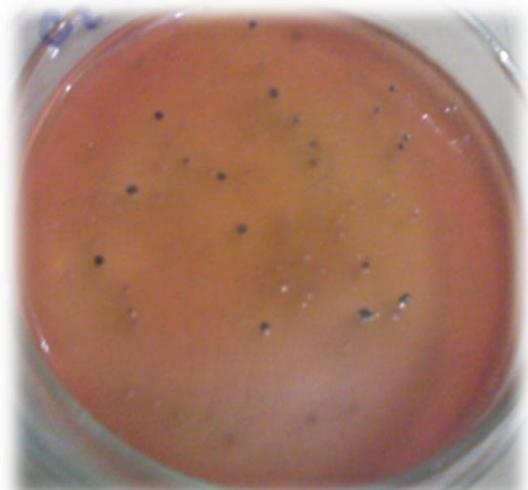
Figura 2 - Pesquisa de *Salmonella* spp.



Figura 3 – Registro fotográfico da feira livre do Município de Jiquiriçá – Bahia.



Estafilococos coagulase positiva



Salmonella spp.

Figura 4 – Placas com colônias de estafilococos coagulase positiva e *Salmonella* spp. isoladas das amostras de carne bovina in natura proveniente da feira livre do município de Jiquiriçá – Bahia.

APÊNDICE 3

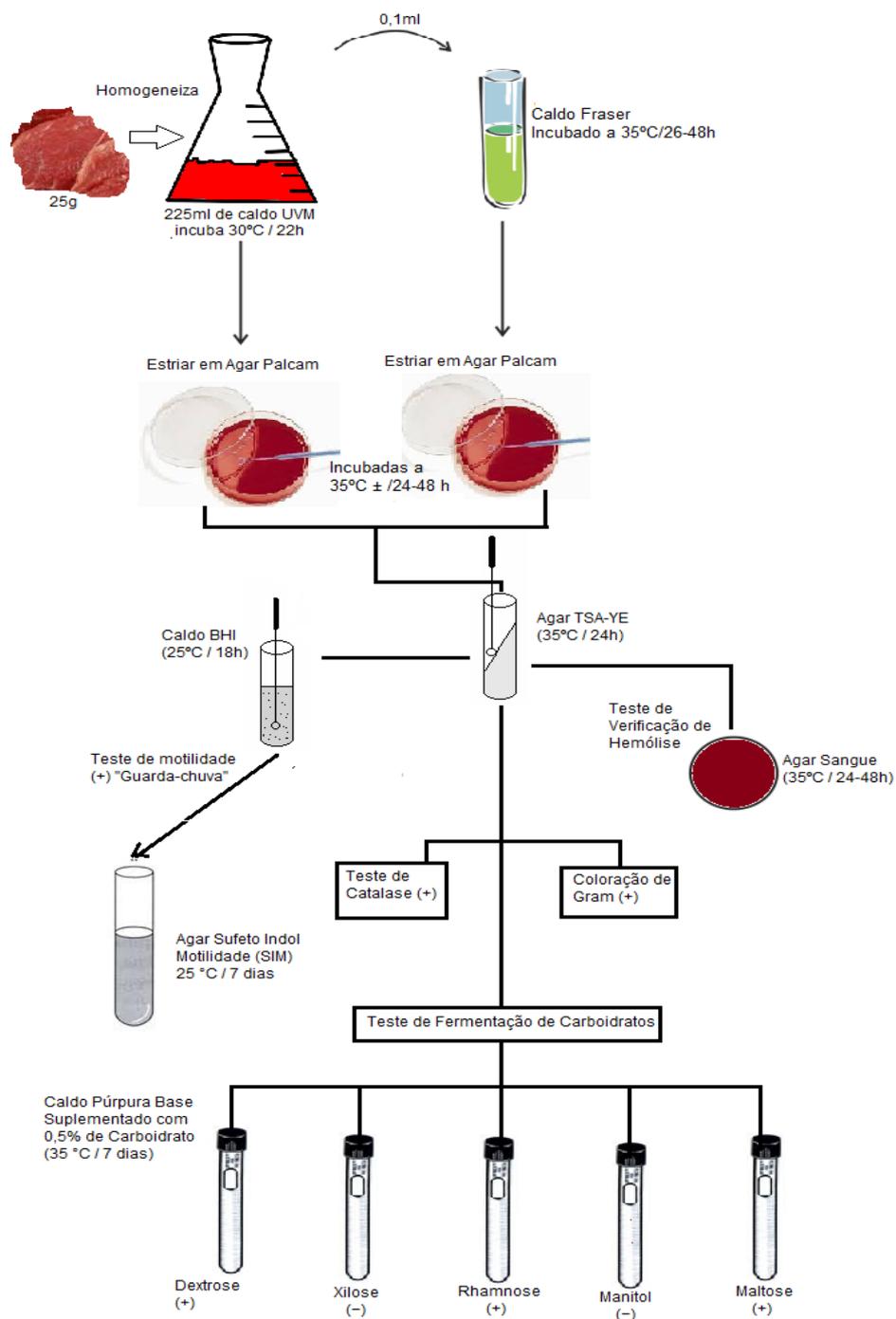
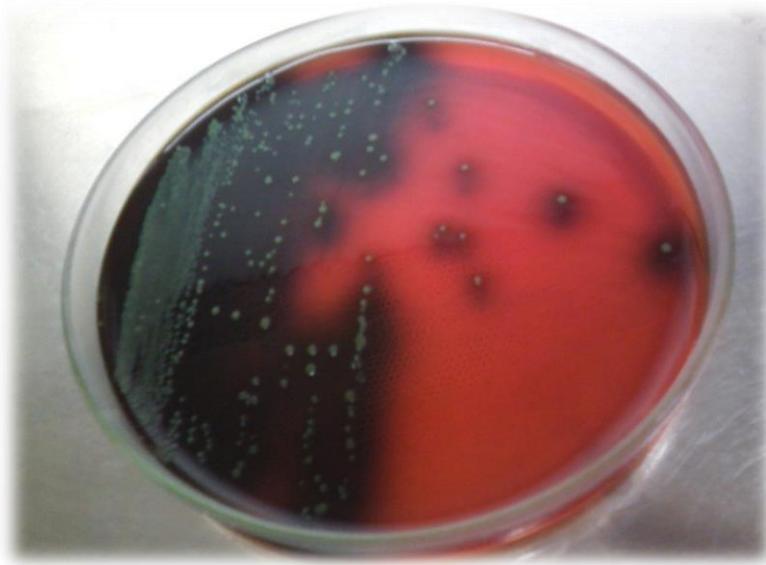


Figura 1 – Pesquisa de *Listeria monocytogenes*.

A



B



Figura 2 – Placas com colônias típicas de *Listeria* spp. isoladas das amostras de carne bovina in natura proveniente da feira livre do município de Jiquiriçá – Bahia (A). Teste de fermentação dos carboidratos (B).

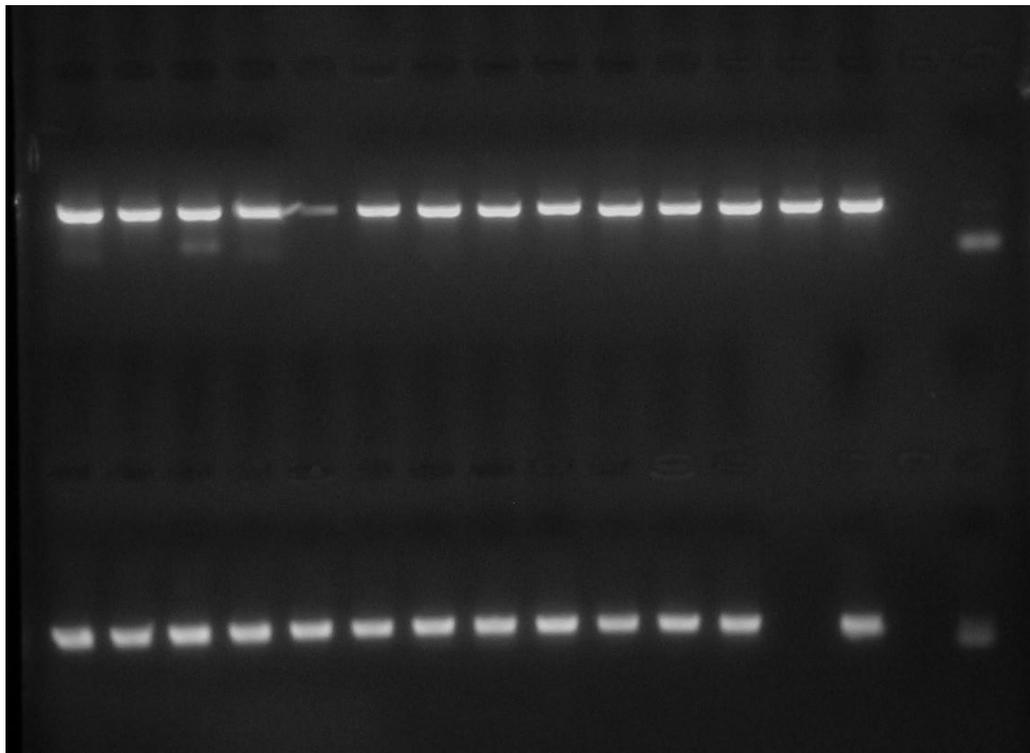


Figura 3 - Padrão eletroforético obtido pela amplificação do DNA das cepas de *Listeria monocytogenes*.

APÊNDICE 4

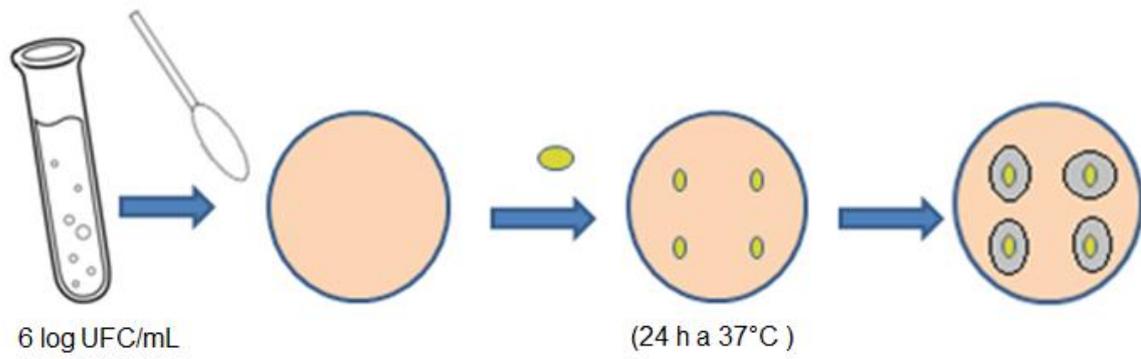


Figura 1 - Teste de difusão em disco.

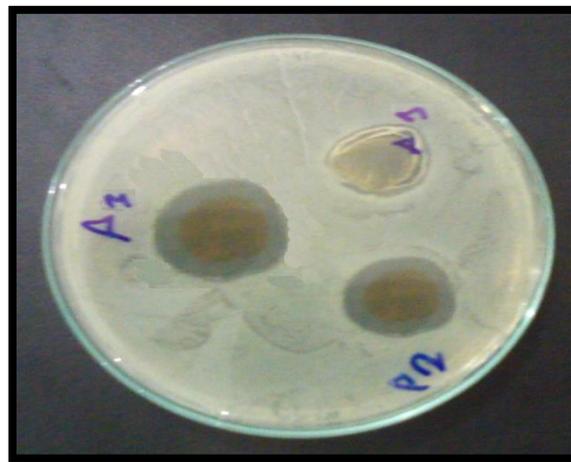


Figura 2 – Antibiograma utilizando discos de quitosana.



Figura 3 – Bifes de carne bovina tratados com solução de quitosana.

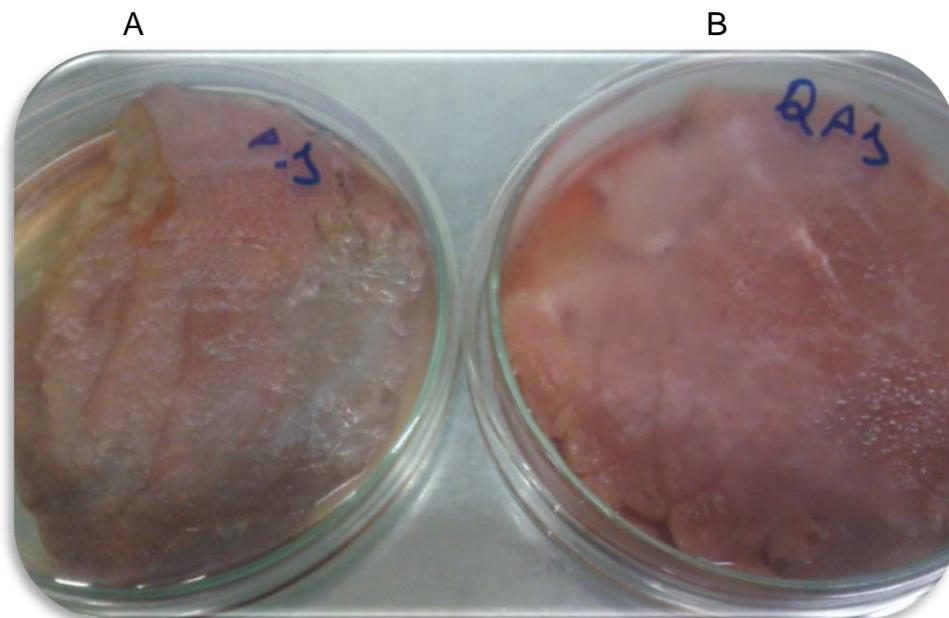


Figura 4 - Bife de carne bovina contaminado sem nenhum tratamento (A). Bife de carne bovina contaminado e posteriormente tratado com solução de quitosana (B).

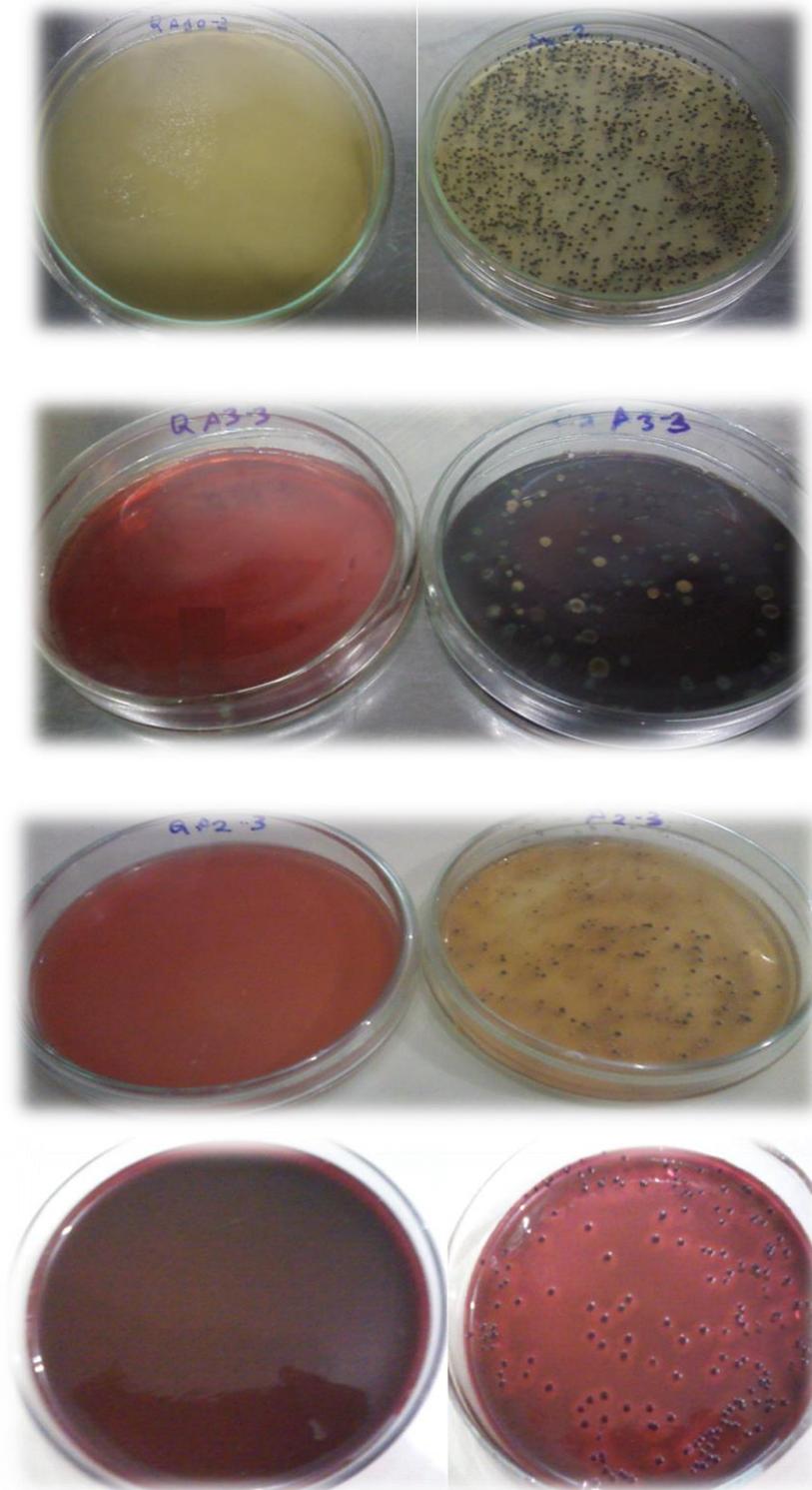


Figura 5 – Resultados análise microbiológica dos bifes de carne bovina contaminados intencionalmente e posteriormente tratados com solução de quitosana a 2% (Esquerda) e dos bifes contaminados intencionalmente e sem tratamento (Direita).