



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MÁRIO SÉRGIO AZEVEDO RESTA

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO ESTAFILOCOCOS COAGULASE  
POSITIVA ESTABELECIDO PELA LEGISLAÇÃO  
BRASILEIRA PARA MASSAS ALIMENTÍCIAS**

MÁRIO SÉRGIO AZEVEDO RESTA

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO ESTAFILOCOCOS COAGULASE  
POSITIVA ESTABELECIDO PELA LEGISLAÇÃO  
BRASILEIRA PARA MASSAS ALIMENTÍCIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tereza Cristina Rocha  
Moreira de Oliveira.

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R436a Resta, Mario Sergio Azevedo  
Avaliação do padrão estafilococos coagulase positiva estabelecido  
pela legislação brasileira para massas alimentícias / Mario Sergio  
Azevedo Resta. -Londrina, 2013. 54f. : il. ; 30 cm

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade  
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Padrão estafilococos coagulase positiva - Teses. 2. Alimentos -  
Microbiologia - Teses. 3. Massas alimentícias - Qualidade - Segurança -  
Teses. 4. *Staphylococcus* - Teses. I. Oliveira, Tereza Cristina Rocha Moreira  
de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641.579

MARIO SERGIO AZEVEDO RESTA

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO ESTAFILOCOCOS COAGULASE  
POSITIVA ESTABELECIDO PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA  
MASSAS ALIMENTÍCIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof- Dr- Tereza Cristina Rocha M. de Oliveira  
UEL – Londrina – PR

---

Prof- Dr- Lourdes Botelho Garcia  
UEM – Maringá – PR

---

Prof-. Dr-. Sandra Garcia  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 29 de maio de 2013.

## **DEDICO**

À minha família, amparo incomparável de todas as horas, esteio fundamental em todas as iniciativas.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por mais esta conquista.

À orientadora, Prof- Dr- Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira, pela orientação precisa, pela compreensão, pela atenção e pela dedicação.

Ao SENAI - DEPARTAMENTO REGIONAL DO PARANÁ, unidade de Londrina, pelo incentivo e pelo apoio, indispensáveis à conquista.

Aos Professores Dr. Fábio Yamashita e Dr- Elza Youssef Youssef, pelo precioso auxílio e pela atenção dispensada, sempre que solicitada.

À estagiária Silvia Maria Passos, pelo auxílio indispensável.

À minha esposa, Alessandra, pela compreensão, apoio, incentivo e companheirismo, sem os quais esta conquista não seria possível e não teria o mesmo significado.

Aos professores do programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, pelo conhecimento transmitido e pela dedicação.

***"Tudo é uma questão de manter a mente quieta, a espinha ereta e o coração tranquilo".***

Walter Franco

RESTA, Mario Sergio Azevedo. **Avaliação do padrão estafilococos coagulase positiva estabelecido pela legislação brasileira para massas alimentícias.** 2013. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

O Brasil é o terceiro produtor e consumidor em volume de massas alimentícias. Em 2011, cerca de 1,3 milhão de toneladas foram produzidas e mais de 8 mil toneladas exportadas. A RDC n.º 12 de 2001 da ANVISA agrupa todos os tipos de massas alimentícias em uma mesma categoria e estabelece o mesmo limite para estafilococos coagulase positiva (ECP), independente das características intrínsecas diferentes que as massas podem apresentar. A intoxicação estafilocócica ocorre devido à ingestão de alimentos contaminados com enterotoxinas termoestáveis produzidas durante a multiplicação de *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos, que é influenciada por vários fatores intrínsecos e extrínsecos do alimento. O objetivo do presente trabalho foi discutir o padrão ECP estabelecido pela legislação brasileira para massas alimentícias com base nos resultados de atividade de água ( $a_w$ ), de potencial hidrogeniônico (pH) e análises microbiológicas. Cinquenta amostras de 25 tipos de massas de treze marcas diferentes foram analisadas. Todas as amostras apresentaram contagem de ECP menor que 10 UFC/g, abaixo do limite de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g estabelecido pela legislação. O pH das massas alimentícias variou de 5,69 a 6,12. A média de  $a_w$  para massas frescas foi de 0,96. As médias de  $a_w$  obtidas para massas secas com e sem recheio foram menores do que 0,70 e 0,61, respectivamente. A necessidade de se investigar a ocorrência de ECP em massas secas torna-se questionável, já que, com esta  $a_w$  a multiplicação de ECP e a produção de toxina estafilocócica não ocorre. A legislação brasileira poderia utilizar, portanto, a  $a_w$  como parâmetro para estabelecer em quais tipos de massa o padrão ECP deveria ser pesquisado. A ausência de células viáveis de *Staphylococcus* spp. não assegura que o produto esteja livre de enterotoxinas. Assim sendo, a implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na cadeia de produção de massas alimentícias é essencial para a obtenção de produtos inócuos, uma vez que a detecção de enterotoxinas nos alimentos é inviável de ser realizada na rotina laboratorial, devido ao alto custo.

**Palavras-chave:** Regulamentação. Atividade de água. pH. *Staphylococcus* spp. Enterotoxina.

RESTA, Mario Sergio Azevedo. **Evaluation of the Coagulase Positive Staphylococci standard established by the Brazilian legislation for pasta.** 2013. 54p. Dissertation (Master's Degree in Food Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## ABSTRACT

Brazil is the third largest producer and consumer in volume of pasta. In 2011, about 1.3 million tons were produced and more than 8 thousand tons were exported. RDC n° 12/2001, ANVISA includes all types of pasta in the same category and sets the same limit for coagulase-positive staphylococci count (ECP), independent of the different intrinsic factors that the types of pasta have. Staphylococcal intoxication occurs due to the ingestion of food contaminated with thermostable enterotoxins produced during the growth of enterotoxigenic *Staphylococcus* spp., which is influenced by several intrinsic and extrinsic factors in food. The aim of this study was to discuss the ECP count limit established by the Brazilian legislation for pasta, based on the results of water activity ( $a_w$ ), hydrogen potential (pH) and microbiological analysis. Fifty samples of 25 pasta types from 13 different brands were analyzed. The ECP counts for all samples were lower than 10 CFU/g, below the limit of  $5.0 \times 10^3$  CFU/g established by the Brazilian legislation. The pasta pH ranged from 5.69 to 6.12. The  $a_w$  average of fresh pasta was 0.96. The  $a_w$  average of dried pasta with and without stuffing were lower than 0.70 and 0.61, respectively. Investigating ECP in dry pasta becomes questionable as the ECP growth and the toxin production do not occur when  $a_w$  is so low. Brazilian legislation could use  $a_w$  as a parameter to determine in which kinds of pasta the ECP count should be done. Absence of viable *Staphylococcus* spp. cells does not ensure that the product is not contaminated with staphylococcal enterotoxin. The implementation of Good Manufacturing Practices (GMP) and the System of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) in the pasta production is essential for obtaining safe products, since the detection of enterotoxins in foods is unfeasible due to the high cost.

**Keywords:** Food regulations. Water activity. pH. *Staphylococcus* spp. Enterotoxin.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Surtos de DTA por agente etiológico no Brasil entre 2000 e 2011 .....20
- Figura 2** – Produção mundial de massas alimentícias em 2011 .....26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Espécies e subespécies de estafilococos .....	16
<b>Tabela 2</b> – Termorresistencia de Enterotoxina B de <i>S. aureus</i> .....	19
<b>Tabela 3</b> – Taxa de perda de atividade por minuto das toxinas estafilocócicas A, B e C.....	19
<b>Tabela 4</b> – Parâmetros que controlam o desenvolvimento de <i>S. aureus</i> em alimentos e que limitam a produção de toxina estafilocócica .....	21
<b>Tabela 5</b> – Valores máximos, mínimos e ótimos para o desenvolvimento de <i>S. aureus</i> em alimentos.....	22
<b>Tabela 6</b> – Valor aproximado de atividade de água ( $a_w$ ) de alguns alimentos .....	24
<b>Tabela 7</b> – Tabela brasileira de composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível .....	25
<b>Tabela 8</b> – Padrões microbiológicos de estafilococos coagulase positiva para o grupo 10 estabelecidos na RDC 012/2001 da ANVISA.....	30
<b>Tabela 9</b> – Tipos de produtos estudados e classificação das amostras por tipo de produto .....	31
<b>Tabela 10</b> – Marcas e variedades de produtos estudados.....	31
<b>Tabela 11</b> – Marcas e variedades de produtos estudados .....	39
<b>Tabela 12</b> – Médias de $a_w$ das amostras analisadas por tipo de produto .....	41
<b>Tabela 13</b> – Médias de pH das amostras analisadas por tipo de produto.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>a<sub>w</sub></b>	Atividade de água
<b>BHI</b>	Caldo infulsão de cérebro e coração
<b>BP</b>	Agar Baird-Parker
<b>CE</b>	Comunidade Europeia
<b>ECP</b>	Estafilococos coagulase positiva
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>g</b>	Grama
<b>h</b>	Hora. Limite que, em um plano de duas classes, separa o aceitável do inaceitável.
<b>M</b>	Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MS</b>	Manitol salgado
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PR</b>	Estado do Paraná, Brasil
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>UFC</b>	Unidade formadora de colônia
<b>UFC/g</b>	Unidade formadora de colônia por grama
<b>UFC/mL</b>	Unidade formadora de colônia por mililitro
<b>VJ</b>	Agar Vogel-Johnson

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	14
<b>3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	15
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
4.1 STAPHYLOCOCCUS SPP. E INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA.....	16
4.2 PH E AW NA MULTIPLICAÇÃO DE STAPHYLOCOCCUS SPP.....	21
4.3 MASSAS ALIMENTÍCIAS.....	24
4.4 MÉTODOS PARA CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-POSITIVA EM ALIMENTOS .....	27
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
5.1 GRUPO DE ALIMENTOS ESTUDADO.....	29
5.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CULTIVO.....	31
5.3 CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA (ECP) .....	32
5.4 PROVAS DE CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA .....	32
5.5 DETERMINAÇÃO DO PH .....	33
5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA (AW) .....	33
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
6.1 ARTIGO CIENTÍFICO: AVALIAÇÃO DO PADRÃO ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA ESTABELECIDO PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA MASSAS ALIMENTÍCIAS.....	36
6.1.1 Introdução.....	37
6.1.2 Material e Métodos .....	38
6.1.3 Resultados.....	41
6.1.4 Discussão .....	42
6.1.5 Conclusão.....	45
6.1.6 Referências.....	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49

## 1 INTRODUÇÃO

Mais de treze milhões de toneladas de massas alimentícias são produzidas anualmente por mais de quarenta e cinco países (IPO, 2012). O Brasil ocupa um papel de destaque no cenário mundial do segmento de massas alimentícias, ocupando a terceira posição de maior produtor e consumidor, atrás apenas da Itália e dos Estados Unidos. Um volume de cerca de 1,3 milhão de toneladas é produzido anualmente, e em 2011 mais de 8 mil toneladas foram exportadas (ABIMA, 2012a). O consumo interno é de cerca de 1,2 milhões de toneladas, porém o Brasil ocupa o vigésimo segundo lugar no consumo per capita de massas alimentícias, com cerca de 6,2 Kg por ano (IPO, 2012).

Apesar da exigência da legislação e do expressivo desempenho brasileiro no mercado mundial de massas alimentícias, poucos estudos tem sido realizados com este tipo de produto antes do seu preparo, principalmente no que diz respeito aos seus padrões microbiológicos. A RDC n.º 12/2001 - ANVISA estabelece padrões microbiológicos para massas alimentícias que incluem limites para *Bacillus cereus* ( $5 \times 10^3$  UFC/g), Coliformes a 45 °C ( $10^2$  UFC/g) *Salmonella* sp. (Ausência em 25 g) e Estafilococos Coagulase Positiva ( $5 \times 10^3$  UFC/g) (BRASIL, 2001).

Dentre os padrões estabelecidos pela RDC n.º 12/2001 - ANVISA para massas alimentícias destaca-se o de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) pelo limite adotado ( $M = 5 \times 10^3$  UFC/g) e também pela forma com que foram agrupados os produtos. Todos os tipos de massa foram incluídos em uma mesma categoria, independente de suas características distintas (secas, frescas, conservadas sob refrigeração, com ou sem recheio, entre outras).

Sabe-se que a intoxicação estafilocócica ocorre devido a ingestão de alimentos contaminados com enterotoxinas termoestáveis geralmente produzidas por *Staphylococcus aureus*, cuja produção é influenciada por vários fatores intrínsecos do alimento, tais como tamanho do inóculo inicial, competição da microbiota, pH, concentração de cloreto de sódio e atividade de água, assim como pela temperatura de armazenamento (JAY, 2005).

A contagem de ECP é reconhecida internacionalmente como um padrão microbiológico de segurança de alimentos e importante indicador das condições higiênico-sanitárias da produção e conservação. A sua relação com as condições higiênico-sanitárias dos alimentos está ligada ao fato de que o principal

reservatório natural de *S. aureus* é o ser humano, seja na pele, mucosas, e principalmente no trato naso-faríngeo de portadores assintomáticos (TONDO; BARTZ, 2012). Entretanto, a presença de ECP não é suficiente para assegurar que o alimento está contaminado com suas enterotoxinas, assim como a ausência de ECP no momento da análise também não assegura que o alimento não tenha sido previamente contaminado com enterotoxinas estafilocócicas (LANCETTE; BENNET, 2001).

Sabendo-se que as características físico-químicas dos alimentos (atividade de água, pH e temperatura de conservação ou armazenamento) têm impacto no desenvolvimento do gênero *Staphylococcus* (JAY, 2005), questionou-se se os parâmetros relacionados ao padrão ECP para massas alimentícias atualmente definidos na legislação brasileira (RDC n.º 12/2001 - ANVISA), são pertinentes e coerentes com a realidade atual dos produtos industrializados encontrados no mercado. A obrigatoriedade da avaliação periódica destes grupos de alimentos por parte dos produtores gera custos para a indústria e pode comprometer a agilidade na liberação de lotes para o consumo.

Tendo em vista o exposto, o propósito do presente trabalho foi discutir o padrão ECP estabelecido pela RDC n.º 12/2001 - ANVISA para massas alimentícias com base nos resultados da análise de amostras de marcas variadas, coletadas em diversos pontos de venda. Valores de atividade de água ( $a_w$ ) e de potencial hidrogeniônico (pH), foram determinados com a finalidade de se obter subsídios para justificar ou contestar o referido padrão microbiológico. Padrões estabelecidos para ECP na legislação de outros países também foram pesquisados.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Obter subsídios que permitam justificar ou contestar os limites adotados para o padrão estafilococos coagulase positiva estabelecidos na RDC 012/2001 (ANVISA) para massas alimentícias, pertencentes ao Grupo 10 - Farinhas, Massas Alimentícias, Produtos para Panificação, (industrializados e embalados) e Similares.

### 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Pesquisar a ocorrência de estafilococos coagulase positiva em massas alimentícias, que estão incluídas entre outros tipos de produtos no Grupo 10 da RDC 012/2001 da ANVISA;

Verificar a variação de pH e Atividade de Água ( $a_w$ ) entre os produtos estudados e sua correlação com a ocorrência de Estafilococos Coagulase Positiva;

Pesquisar padrões estabelecidos para estafilococos coagulase positiva na legislação de outros países;

Discutir a pertinência dos limites adotados para o padrão estabelecido para estafilococos coagulase positiva pela RDC 012/2001 da ANVISA para massas alimentícias.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 STAPHYLOCOCCUS SPP E INTOXICAÇÃO ESTAFILOCÓCICA

*Staphylococcus* spp. são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos que podem apresentar agrupamentos na forma de "cachos de uvas" (SIQUEIRA, 1995). São divididos em dois grupos: coagulase positiva e coagulase negativa, de acordo com a sua capacidade de produzir coagulase (BRASIL, 2004). Atualmente, o gênero *Staphylococcus* inclui 45 espécies e 27 subespécies, apresentadas na Tabela 1. Cinco espécies são coagulase positiva: *S. aureus* (subespécie aureus), *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleifen* (subespécie coagulans) (JAY, 2005; SILVA; GANDRA, 2004).

**Tabela 1** – Espécies e subespécies de estafilococos.

<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> e subsp. <i>aureus</i> ;	<i>S. arlettae</i> ;
<i>S. auricularis</i> ;	<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> e subsp. <i>urealyticus</i> ;
<i>S. caprae</i> ;	<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> ;
<i>S. chromogenes</i> ;	<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> e subsp. <i>urealyticus</i> ;
<i>S. delphini</i> ;	<i>S. epidermidis</i> ;
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> e subsp. <i>linens</i> ;	<i>S. felis</i> ;
<i>S. fleurettii</i> ;	<i>S. gallinarum</i> ;
<i>S. haemolyticus</i> ;	<i>S. warneri</i> ;
<i>S. hyicus</i> ;	<i>S. intermedius</i> ;
<i>S. kloosii</i> ;	<i>S. lentus</i> ;
<i>S. lugdunensis</i> ;	<i>S. lutrae</i> ;
<i>S. muscae</i> ;	<i>S. pasteurii</i> ;
<i>S. pettenkoferi</i> ;	<i>S. piscifermentans</i> ;
<i>S. pseudintermedius</i> ;	<i>S. saccharolyticus</i> ;
<i>S. simulans</i> ;	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferieri</i> e subsp. <i>coagulans</i> ;
<i>S. vitulinus</i> ;	<i>S. simiae</i> ;
<i>S. xylosus</i> .	<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i> e subsp. <i>succinus</i> ;
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> , subsp. <i>rodentium</i> e subsp. <i>sciuri</i> ;	
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> e subsp. <i>saprophyticus</i> ;	
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> e subsp. <i>novobiosepticus</i> ;	

Fonte: Bergeron et al. (2011)

*S. aureus* é um patógeno versátil, capaz de provocar uma grande variedade de infecções, secretando várias substâncias tóxicas, entre elas as enterotoxinas estafilocócicas (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010). A intoxicação estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contaminados pela toxina pré-formada. A doença inicia com quadro emético após curto período de incubação, que varia de 2 a 4 horas após a ingestão do alimento. Os principais sintomas são náuseas, vômito, câimbras abdominais e diarreia, podendo ocorrer dor de cabeça, dor muscular e prostração (SANTANA et al., 2010). Embora seja a terceira causa

mais comum de doença de origem alimentar (ACCO et al., 2005), a subnotificação é comum porque a intoxicação é autolimitada, dificilmente levando a um quadro grave de doença (PINTO; CHENOLL; AZNAR, 2005).

os seres humanos são os principais reservatórios de estafilococos. cerca de 30 a 40% dos seres humanos são portadores assintomáticos de *S. aureus*, presente principalmente nas mucosas nasal e oral (nasofaringe), e com menor frequência em outros locais como ouvidos, mãos e pele (TONDO; BARTZ, 2012). A presença de *S. aureus* em alimentos é interpretada, geralmente, como indicação de contaminação causada por manipuladores, mas também de condições inadequadas de limpeza e sanificação de materiais e equipamentos utilizados no processo de produção.

Altas contagens de *S. aureus* indicam perigo potencial à saúde pública devido à possível presença de enterotoxina estafilocócica no alimento (PIETROWSKI et al., 2008). *S. aureus* é a espécie mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, porém *S. intermedius* e *S. hyicus* podem produzir enterotoxinas, e também já foram envolvidos em surtos (SILVA; GANDRA, 2004).

Os alimentos frequentemente envolvidos em intoxicações alimentares causadas por *S. aureus* são: carnes e produtos derivados, produtos de ovos, peixe, batata e massas (preparadas e prontas para o consumo), laticínios, produtos de confeitaria, como o bolo de creme e creme. os surtos estão normalmente associados a produtos que exigem grande manipulação durante a preparação, e que muitas vezes são mantidos em temperatura ambiente (SIQUEIRA, 1995; JAY, 2005; TONDO; BARTZ, 2012). É incomum a ocorrência de surtos de intoxicação estafilocócica nos quais massas alimentícias cruas (antes do preparo) sejam o veículo para tais toxinas (WOOLAWAY; BARTLETT; WIENEKE, 1986).

As enterotoxinas produzidas por *S. aureus* são sintetizadas durante a fase de crescimento exponencial (*log*) ou na transição entre as fases de crescimento exponencial e a fase estacionária (DERZELLE et al., 2009). As enterotoxinas estafilocócicas são caracterizadas como sendo proteínas que apresentam resistência à ação de enzimas proteolíticas, como tripsina, renina, papaína, pepsina e quimiotripsina. Atuam como superantígenos, envolvendo a estimulação sistêmica de um grande número de células T (NASCIMENTO et al.,

2009). São conhecidos mais de 20 tipos diferentes de enterotoxinas estafilocócicas (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010), com massas moleculares que variam de 24,8 a 28,1 kDa (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). A enterotoxina do tipo A é a causa mais comum de intoxicação estafilocócica, embora o envolvimento de outras enterotoxinas clássicas tenha sido relatado (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). Um estudo revelou grande variedade de cepas de *S. aureus* que são portadores de genes codificadores de toxinas diferentes daquelas identificáveis por métodos tradicionais. Entretanto, a relevância da presença dessas toxinas em alimentos e seu possível impacto como causa na intoxicação alimentar causada por *S. aureus* em humanos ainda é desconhecida e estudos complementares são necessários, utilizando tanto métodos tradicionais como moleculares (GIANNATALE et al., 2011).

O *International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigen* recomendou que apenas os superantígenos estafilocócicos que induzem vômito após administração oral experimental em macacos deveriam ser designados como enterotoxinas estafilocócicas. Aqueles que não promovem emese no modelo experimental designado, ou que não tenham sido testados devem receber a denominação de "*staphylococcal enterotoxin-like*" (SEI). Desta forma, as enterotoxinas dos tipos SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ e SEU deveriam ser renomeadas para SEU, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ e SEIU, respectivamente (OMOE et al., 2005). Para Franco e Landgraf (2008), as toxinas estafilocócicas deveriam ser consideradas neurotoxinas, devido à sua forma de ação, que envolve estímulos ao sistema nervoso central (centro do vômito) através dos nervos vago e simpático.

Há divergências quanto à dose de enterotoxina necessária para causar sintomas em seres humanos. Estima-se que quantidades entre 0,015 e 0,375 ug de enterotoxina por quilo de peso corpóreo sejam suficientes, considerando-se as características individuais (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Segundo Santana et al. (2010) a dose mínima para causar intoxicação é 100 ng.

As enterotoxinas estafilocócicas são detectáveis nos alimentos que apresentam populações de *S. aureus* acima de  $10^5$  UFC/g de alimento. Segundo Franco e Landgraf (2008), contagens entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/g de alimento são necessárias para que haja formação de toxina em níveis capazes de provocar intoxicação. Entretanto, a presença de um grande número de estafilococos em um

alimento não é suficiente para incriminar o alimento como o responsável pela intoxicação, assim como, a ausência desse patógeno não o exclui como causador da doença. A estabilidade térmica das enterotoxinas estafilocócicas (Tabela 2) exige que o potencial enterotoxigênico dos estafilococos e ou a presença da enterotoxina no alimento seja determinado (BENNET; LANCETTE, 2001).

**Tabela 2** – Termorresistência de Enterotoxina B de *S. aureus*.

Temperatura (°C)	Valor D* (Minutos)	Meios
98,9	68,5	Leite
104,4	46,2	Leite
110,0	26,1	Leite
115,6	16,6	Leite
121,1	9,4	Leite
126,7	6,2	Leite

**Fonte:** Price (1997). \*O valor D (valor de redução decimal) é o tempo exigido para destruir 90% da toxina a uma temperatura específica em um meio específico.

Tibana et al. (1986), estudando a estabilidade térmica das toxinas estafilocócicas A, B e C em um sistema tamponado, mostrou que tempos e temperaturas normalmente empregados no preparo de alimentos não são capazes de inativar estas toxinas. A Tabela 3 apresenta a perda de atividade das toxinas encontrada neste estudo.

**Tabela 3** – Taxa de perda de atividade por minuto das toxinas estafilocócicas A, B e C.

Enterotoxina Estafilocócica	Taxa de perda de atividade (% por minuto)		
	80 °C	100 °C	120 °C
A	0,54	7,74	27,84
B	0,63	5,78	21,48
C	0,50	5,12	17,59

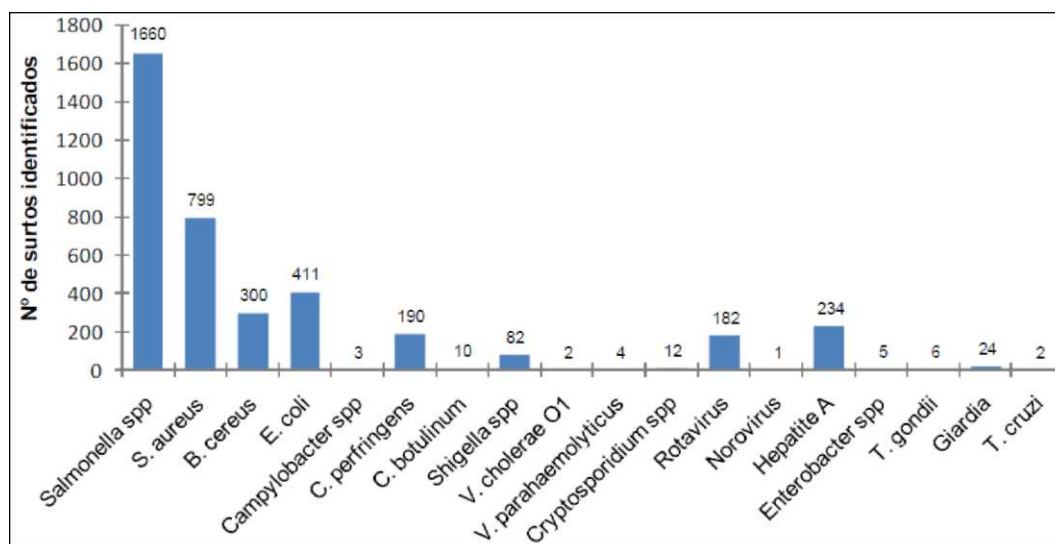
**Fonte:** Tibana et al. (1986)

Poucos dados epidemiológicos a respeito das doenças veiculadas por alimentos estão disponíveis no Brasil, mas estima-se que as intoxicações estafilocócicas sejam muito comuns no país. A maioria dos casos, no entanto, não são investigados e ou notificados. As falhas no diagnóstico clínico e laboratorial são muitas vezes o principal motivo para as subnotificações (SANTANA et al., 2006).

Dos 8.663 surtos de DTAs registrados no Brasil entre 2000 e 2011 (Figura 1), aproximadamente 54,7% (4.736/8.663) foram encerrados sem confirmação do agente etiológico. Dos 3.927 casos em que houve a confirmação do agente etiológico, aproximadamente 42,3% (1.660/3.927) foram causados por

*Salmonella* spp. e em torno de 20,3% (799/3.927) por *S. aureus*. Outros agentes etiológicos identificados totalizaram 37,3% dos casos (1.468/3.927) (BRASIL, 2011).

**Figura 1** – Surtos de DTA por agente etiológico no Brasil entre 2000 e 2011.



Fonte: BRASIL (2011).

A Agência de Saúde de Minas Gerais investigou, entre fevereiro e maio de 1999, dois surtos de intoxicação alimentar, envolvendo 378 indivíduos. No primeiro surto, 50 pessoas ficaram doentes após ingestão de queijo minas frescal. Os sintomas de intoxicação alimentar (diarréia, vômitos, tonturas, calafrios e dores de cabeça) apareceram em até 2 horas após a ingestão. O segundo surto envolveu 328 indivíduos, que apresentaram sintomas de diarréia e vômito após consumir leite cru. A análise das amostras desses alimentos mostrou contaminação por enterotoxinas dos tipos A, B e C, e contagens de *S. aureus* de  $2,4 \times 10^3$  UFC/g (queijo) e  $2,0 \times 10^8$  UFC/ml (leite não pasteurizado) (CARMO et al., 1995).

Nos Estados Unidos, segundo o CDC (2000), entre 1993 e 1997, foram registrados 42 surtos de intoxicação alimentar por *S. aureus*, totalizando 1.413 casos, com 1 óbito. No reino unido, de 1992 a 2006 foram registrados 37 surtos, envolvendo 505 casos (HPA, 2013).

Na Itália, um estudo para avaliar a contaminação de vários alimentos de origem animal por *S. aureus* com 350 amostras analisadas, mostrou que 49 (14%) estavam contaminadas com *S. aureus* em níveis aceitáveis (abaixo de  $10^3$  UFC/g), com destaque para queijos frescos e produtos cárneos (13,3% e 19,3%, respectivamente). Entretanto, apenas 2,3% das cepas isoladas eram

enterotoxigênicas. As toxinas detectadas eram dos tipos C (7/8) e A (1/8) (GIANNATALE, et al., 2011).

Fatores intrínsecos e extrínsecos podem controlar o desenvolvimento de *S. aureus* e limitam a produção de enterotoxina estafilocócica nos alimentos (Tabela 4).

**Tabela 4** – Parâmetros que controlam o desenvolvimento de *S. aureus* em alimentos e que limitam a produção de enterotoxina estafilocócica.

Parâmetros	Valores	
	Desenvolvimento	Produção de Enterotoxina
Temperatura mínima	5,6 °C	10 °C
Temperatura máxima	50 °C	48 °C
pH mínimo	4,3	4,76
pH máximo	10	9,02
a <sub>w</sub> mínima	0,83	0,87
% máxima de NaCl	20	12

**Fontes:** Price (1997); ICMSF (1996).

A minimização de abusos de tempo e temperatura, especialmente depois da cocção, e a exigência de que os manipuladores de alimentos sigam as Boas Práticas de Higiene (higiene pessoal) para evitar a contaminação do alimento já pronto para consumo, são algumas das medidas recomendadas para se evitar intoxicações por *S. aureus*.

#### 4.2 PH E AW NA MULTIPLICAÇÃO DE STAPHYLOCOCCUSSPP.

Valores de pH adversos afetam pelo menos dois aspectos de uma célula viva: as suas funções enzimáticas e o transporte de nutrientes para o ambiente intracelular. Em função disto, o crescimento de microrganismos em faixas de pH diferentes daquela considerada ótima acaba resultando em uma fase de adaptação (*lag*) mais longa, podendo causar a sua inativação (JAY, 2005; TONDO; BARTZ, 2012).

A maioria dos microrganismos cresce melhor com valores de pH entre 6,5 e 7,5, apesar de alguns mais resistentes conseguirem se desenvolver em pH abaixo de 4,0. Normalmente, as bactérias patogênicas são muito exigentes em termos de pH (TONDO; BARTZ, 2012). Entretanto, o *S. aureus* pode ser considerado um dos mais resistentes, pois é capaz de se multiplicar em pH próximo a 4,0 (JAY, 2005; SIQUEIRA, 1995).

Os alimentos, na sua maioria, possuem valores de pH abaixo de 7,0 (JAY, 2005), e são divididos em três grupos: alimentos de baixa acidez ( $\text{pH} > 4,5$ ), alimentos ácidos ( $4,5 > \text{pH} > 4,0$ ), e alimentos muito ácidos ( $\text{pH} < 4,0$ ). Alimentos que apresentam valores de  $\text{pH} > 4,0$  estão mais sujeitos ao desenvolvimento microbiano (FRANCO; LANDGRAF, 2008), inclusive de *Staphylococcus* spp.

*S. aureus* é capaz de se desenvolver em ampla faixa de temperatura e pH, o que o torna capaz de se multiplicar em diferentes alimentos. Alimentos contaminados com cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos, quando deixados em temperaturas favoráveis ao desenvolvimento, como por exemplo refrigeração inadequada, são fontes comuns de intoxicação estafilocócica (PINCHUK; BESWICK; REYES, 2010). Banwart (1989) afirma que *S. aureus* requer valores mínimos de pH entre 4,0 e 4,7 para sua multiplicação, sendo que a faixa considerada ótima está entre 6,0 e 7,0. Na Tabela 5 estão apresentados alguns valores de temperatura, atividade de água e pH relacionados à multiplicação de *S. aureus*, segundo Siqueira (1995).

**Tabela 5** – Valores de temperatura,  $a_w$  e pH máximos, mínimos e ótimos para o desenvolvimento de *S. aureus* em alimentos.

PARÂMETROS		VALORES REPORTADOS
Temperatura (°C)	Mínima	6,5
	Ótima	30 - 37
	Máxima	45
Atividade de água ( $a_w$ )	Mínima	0,86
	Mínimo	4,2
Potencial hidrogeniônico (pH)	Ótimo	7,0 - 7,5
	Máximo	9,3

Fonte: Siqueira (1995), p. 119.

O controle da umidade é um dos métodos conhecidos mais antigos para conservação de alimentos, e os microbiologistas de alimentos descrevem as necessidades de água dos microrganismos em termos de  $a_w$  do alimento (JAY, 2000). Microrganismos precisam de água em forma disponível para se desenvolverem em matrizes alimentares, pois a diminuição da  $a_w$  pode aumentar a fase de adaptação (*lag*) dos microrganismos (JAY, 2005). O crescimento microbiano, e em alguns casos a produção de seus metabólitos podem ser particularmente

sensíveis às alterações de  $a_w$ , o que gera a possibilidade de muitos patógenos bacterianos serem controlados em valores de  $a_w$  inferiores a 0,86, equivalente a uma solução de 22% de NaCl. *S. aureus* é a única bactéria patogênica que pode se desenvolver e produzir toxinas com  $a_w$  abaixo de 0,90 (JAY, 2005; FDA, 2013).

Jay (2005) classifica os alimentos quanto à sua umidade e  $a_w$ , com base nos seguintes parâmetros: alimentos secos ou com umidade baixa (UB), que apresentam até 25% de umidade e  $a_w$  entre 0,00 e 0,60; e alimentos com umidade intermediária (UI), os quais possuem entre 15 e 50% de umidade, e  $a_w$  entre 0,60 e 0,85. Devido ao fato de a maioria das bactérias necessitar de  $a_w$  superior a 0,9 para que possa se desenvolver, elas praticamente não causam deterioração de alimentos secos, pois com uma  $a_w$  de 0,65 pouquíssimos microrganismos são capazes de crescer.

O desenvolvimento e a produção de enterotoxina estafilocócica do tipo A em presunto cru seco e curado (*dry-cured raw ham*) foram estudadas por Untermann e Müller (1992). Esses autores verificaram que em valores de  $a_w$  abaixo de 0,92 não houve produção de enterotoxina em níveis detectáveis quando o produto foi mantido à temperatura de 20 °C por até 7 dias. A produção de enterotoxina ocorreu, em temperaturas superiores a 20 °C. Em valores de  $a_w$  em torno de 0,89, a enterotoxina foi formada apenas quando o produto foi mantido por 7 dias em temperatura de 35 °C.

O processo de secagem convencional das massas secas utiliza temperaturas entre 40 e 55 °C, passando por uma pré-secagem em ar quente e úmido, iniciando-se com temperatura de 40°C e 55% de umidade relativa, e terminando com temperatura de 75°C e umidade relativa de 99%. Nessas condições, a umidade do produto é reduzida de 30% para até 18% em aproximadamente 45 a 90 minutos, fazendo com que a  $a_w$  estabilize-se entre 0,5 e 0,8, atribuindo-lhe certa estabilidade (GUERREIRO, 2006). A Tabela 6 apresenta valores de atividade de água ( $a_w$ ) para alguns alimentos.

**Tabela 6** – Valor aproximado de atividade de água (aw) para alguns alimentos

Alimentos	Valores de Aa
Pão branco	0,94 – 0,97
Bolo assado	0,90 – 0,94
Farinha	0,67 – 0,87
Crackers	0,10

**Fonte:** Extraído e adaptado de FDA (2013)

#### 4.3 MASSAS ALIMENTÍCIAS

Segundo a Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005 - ANVISA, massas alimentícias são os produtos obtidos da farinha de trigo (*Triticum aestivum* L.) e ou de outras espécies do gênero *Triticum* e ou derivados de trigo durum (*Triticum durum* L.) e ou derivados de outros cereais, leguminosas, raízes ou tubérculos, resultantes do processo de empasto e amassamento mecânico, sem fermentação. Podem ser adicionadas de outros ingredientes, acompanhadas de complementos isolados ou misturados à massa, desde que não descaracterizem o produto, e apresentadas secas, frescas, pré-cozidas, instantâneas ou prontas para o consumo, em diferentes formatos e recheios (BRASIL, 2005).

A Resolução RDC nº 93, de 31 de outubro de 2000 - ANVISA, que estabelecia o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade deste produto (BRASIL, 2000), incluindo diferenciação entre massa alimentícia seca (umidade máxima 13%) e fresca (umidade máxima 35%), foi revogada pela Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005 - ANVISA, que está vigente. Muito mais abrangente, a RDC nº 263/2005 estabelece o regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos, no qual não há referência a tais diferenças (BRASIL, 2005). Quanto às características microbiológicas dos produtos, ambas as resoluções referenciam-se à legislação específica, que atualmente é a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 - ANVISA.

A qualidade e a conveniência de massas frescas embaladas em atmosfera modificada provocou certa alteração no perfil de comercialização deste tipo de produto no Brasil, fazendo com que atualmente massas frescas de boa qualidade possam ser facilmente encontradas em grandes redes de supermercados,

uma vez que sua vida útil gira em torno de 30 a 45 dias quando embalagens com atmosfera modificada são conservadas sob refrigeração (GUERREIRO, 2006).

As massas alimentícias são compostas principalmente por carboidratos (Tabela 7), apresentando, normalmente, baixas concentrações de gordura e minerais como ferro, cálcio e zinco (DENDY; DOBRASZCZYK, 2001). Os cereais, assim como as massas alimentícias têm grande proporção de carboidratos complexos, que são metabolizados lentamente, não gerando picos hiperglicêmicos. Por este motivo, tornam-se muito valiosos para diabéticos e pessoas que praticam exercícios físicos por longos períodos (DENDY; DOBRASZCZYK, 2001). Adicionalmente, os carboidratos complexos exercem também importante papel como veículos de vitaminas e fibras dietéticas (FRANK; SOARES, 2005).

**Tabela 7** – Tabela brasileira de composição de alimentos por 100 gramas de parte comestível.

Alimento	Umidade (g)	Proteína (g)	Lipídios (g)	Carboidratos (g)	Fibra Alimentar (g)	Cinzas (g)	Ca (mg)	Fe (mg)	Z (mg)
Lasanha, massa fresca, cozida	59,6	5,8	1,2	32,5	1,6	0,9	10	1,2	0,4
Lasanha, massa fresca, crua	45	7,0	1,3	45,1	1,6	1,6	17	1,9	0,8
Macarrão instantâneo	6,0	8,8	17,2	62,4	5,6	5,6	18	0,8	0,5
Macarrão, trigo, cru	10,2	10,0	1,3	77,9	2,9	0,5	17	0,9	0,8
Macarrão, trigo, cru, com ovos	10,6	10,3	2,0	76,6	2,3	0,5	19	0,9	0,8

**Fonte:** Núcleo de Estudos e pesquisa em Alimentação - UNICAMP (2011).

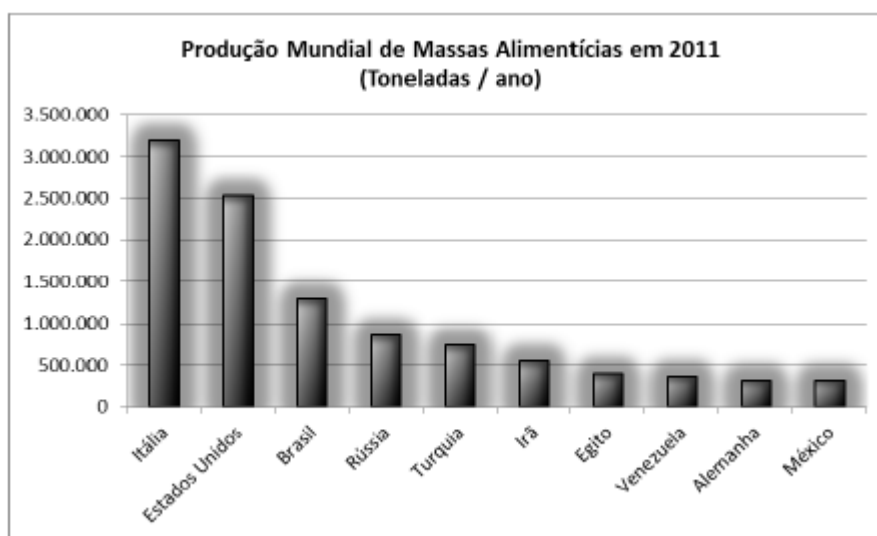
O Brasil tem um papel de destaque no cenário mundial, ocupando a posição de terceiro maior produtor de massas alimentícias, atrás apenas da Itália e dos Estados Unidos, com um volume anual de mais de 1 milhão de toneladas (ABIMA, 2012a), como mostra a Figura 2.

O processo de abertura econômica vivenciado pelo país, a partir dos anos 90, introduziu novos desafios no mercado brasileiro e resultou em mudanças estruturais na indústria em geral, sendo que no setor de massas alimentícias estabeleceu contornos decisivos em termos de consolidação mercadológica e impulsionou as empresas a investirem em tecnologia, equipamentos de última geração e capacitação de seus profissionais. O resultado destes investimentos é um parque industrial dos mais modernos do mundo, com capacidade instalada de 1,4

milhão de toneladas e perfeitamente apto a fornecer produtos de qualidade (ABIMA, 2012a).

No Brasil, somente em 2011, foram comercializadas mais de um milhão de toneladas de massas alimentícias, entre massas secas, instantâneas e frescas, gerando um faturamento estimado em mais de 6 bilhões de reais, com consumo per capita destes produtos girando em torno de 6,2 Kg/hab/ano (ABIMA, 2012b).

**Figura 2 –** Produção mundial de massas alimentícias em 2011.



**Fonte:** ABIMA (2012b)

As massas alimentícias secas, no Brasil, são produzidas, em quase sua totalidade, a partir de trigo soft e estão segmentadas em: massa de sêmola com ovos, massa de sêmola, massa comum e massa tipo caseira. Há produção também de massas de grano duro, a partir de matéria prima totalmente importada, que representa apenas 3,0% do volume total comercializado (ABIMA, 2012b).

Existem fábricas de massas alimentícias em todas as regiões do país. São mais de 80 empresas de pequeno, médio e grande porte, além de mais de uma centena de micro empresas que trabalham na produção de massa artesanal, totalizando mais de 20.000 empregos diretos. Muitas empresas do setor possuem processo integrado com moinho de trigo e, em geral, possuem um amplo portfólio com outros produtos derivados do trigo, como farinha, mistura para bolo, biscoitos, bolo pronto, entre outros (ABIMA, 2012c).

#### 4.4 MÉTODOS PARA CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA EM ALIMENTOS

As principais características utilizadas para o isolamento de ECP são algumas de suas habilidades seletivas, como a capacidade de desenvolvimento em concentrações de 10% de NaCl, a capacidade de reduzir o telurito de potássio, a habilidade para hidrolizar gema de ovo por ação de lipases e lecitinases, a capacidade de fermentar o manitol e a atividade de termonuclease e coagulase, além de outras (SILVA et al., 2010). Meios de cultura sólidos com 7,5% de NaCl inibem a maioria das bactérias, exceto *Staphylococcus* spp. (CHAPMAN, 1945), com a vantagem de possibilitar o isolamento seletivo deste gênero.

Vários métodos estão disponíveis para a contagem de ECP, cujos níveis de sensibilidade variam em função das características seletivas e diferenciais. O meio mais empregado é o ágar Baird-Parker (BP), considerado mais apropriado para a reparação de células injuriadas, e por apresentar características seletivas e diferenciais que facilitam a identificação das colônias (SILVA, 1997).

O ágar Vogel-Johnson é um meio de cultura seletivo-diferencial utilizado alternativamente para isolamento de *S. aureus*, que se baseia na fermentação do manitol e redução do telurito, contendo como indicador de pH o vermelho de fenol. Embora seja recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 1990), é um meio considerado restritivo para células injuriadas, não devendo ser utilizado para alimentos em que se espera a presença com células nestas condições (SILVA, 1997). Outros meios de cultivo estão disponíveis para a contagem direta em placas, como por exemplo, o ágar manitol salgado e o ágar azida gema de ovo, que também são considerados restritivos quanto à reparação de células injuriadas.

O método internacionalmente empregado, recomendado pela norma EN ISO 6888-1:1999 - *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) — Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium* preconiza o uso de ágar Baird-Parker, utilizado também para isolamento e identificação de estafilococos coagulase positiva, assim como a Instrução Normativa 62, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003). Resumidamente, o método consiste em inocular alíquotas de 0,1 mL das diluições

das amostras de alimentos em ágar Baird-Parker, adicionado de telurito de potássio a 0,01% (p/v) e emulsão de gema de ovo a 5 % (v/v) e incubação das placas a 35-37 °C por 48 horas. Após a incubação, é realizada a contagem do número de colônias típicas sugestivas de *S. aureus* (com coloração negra brilhante, zona de precipitação branca ao seu redor e circundada por um halo transparente) e atípicas (sugestivas de outras espécies), obtendo-se assim o valor da contagem presuntiva de unidades formadoras de colônias de *Staphylococcus* spp. por grama. O mesmo procedimento é também recomendado pelos governos do Canadá (CANADA, 2005), dos Estados Unidos da América, através do FDA (BENNET; LANCETTE, 2001).

A identificação de ECP isolado no ágar BP ou no ágar VJ deve ser confirmada com a prova da coagulase, que pode ser realizada em tubo ou lâmina. Em lâmina, o teste baseia-se no fato de que a maioria das cepas de *S. aureus* possui a coagulase ligada (ou fator aglutinante - "*clumping factor*") na superfície da parede celular, que reage com o fibrinogênio do plasma causando a coagulação do mesmo. Quando realizado em tubos, o teste baseia-se na presença da coagulase livre, que reage com um fator plasmático, formando um complexo que atua sobre o fibrinogênio formando a fibrina (BRASIL, 2004).

Resultados de pesquisas indicam que a fraca atividade de coagulase (reações dos tipos 1+, 2+ e 3+) raramente corresponde com outros critérios associados com *S. aureus*, e por isto convencionou-se que uma reação de coagulase 4+ é necessária para a identificação inquestionável de *S. aureus*. Como consequência, as colônias suspeitas de serem *S. aureus* com base em fraca atividade de coagulase devem ser confirmadas por outros ensaios, tais como a fermentação anaeróbica da glicose, sensibilidade à lisostafina, e produção de termonuclease (BENNET; LANCETTE, 2001).

Estudos da morfologia das colônias em ágar Baird-Parker, sensibilidade à lisostafina, produção de coagulase e termonuclease, e fermentação de glicose e manitol foram realizados em 100 cepas enterotoxigênicas e 51 cepas não enterotoxigênicas de *S. aureus*. Os resultados das provas bioquímicas das cepas enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas variaram em 12% ou menos. Esta pesquisa indicou que nenhum desses testes pode ser considerado totalmente confiável para diferenciar estafilococos toxigênicos e não toxigênicos (BENNET et al., 1986).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 GRUPO DE ALIMENTOS ESTUDADO

O grupo de alimentos estudado, denominado pela RDC 012/2001 (ANVISA) como **Grupo 10** - Farinhas, Massas Alimentícias, Produtos para e de Panificação, (industrializados e embalados) e similares, abrange as seguintes categorias (BRASIL, 2001):

- a) amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados;
- b) massas alimentícias secas, com ou sem ovos, com ou sem recheio; massas alimentícias frescas, cruas e não fermentadas, com ou sem ovos, com ou sem recheio e cobertura, e similares, refrigeradas.
- c) produtos semielaborados, com ou sem recheio, com ou sem cobertura (pão de queijo, de batata e similares, pizza, pastéis), refrigerados e similares.
- d) pão sem recheio e sem cobertura e produtos de panificação (roschas, farinha de rosca, torradas e pão tipo sueco, com ou sem sabores) e similares;
- e) panetones, pães de Páscoa, bolos, massa pronta para tortas e similares, prontos para uso ou consumo, estáveis à temperatura ambiente
- f) bolachas e biscoitos, sem recheio, com ou sem cobertura, incluindo pão de mel, cookies e similares.
- g) bolachas e biscoitos, com recheio, com ou sem cobertura, incluindo pão de mel, cookies, alfajores e similares.
- h) mistura em pó com ou sem ovos para bolos, pães, tortas, empadas, pizzas e similares;
- i) cereais matinais, extrudados
- j) produtos a base de amidos, farinhas, féculas e fubá, semi elaborados, estáveis à temperatura ambiente;
- l) farelo e fibras de cereais, com ou sem mistura de farinhas, de outros produtos de cereais, com ou sem adições de outros ingredientes e similares
- m) cereais compactados, em barra ou outras formas, com ou sem adições
- n) granola e mistura de cereais não compactados, com ou sem adições, e similares.

Os limites estabelecidos para o padrão estafilococos coagulase positiva (ECP) estabelecidos na referida RDC para o grupo 10 estão expressos na Tabela 8.

**Tabela 8** – Padrões microbiológicos de estafilococos coagulase-positiva para o grupo 10 estabelecidos na RDC 012/2001 da ANVISA

Categorias de alimentos*	Tolerância na amostra indicativa	Tolerância na amostra representativa			
		N	C	m	M
<b>GRUPO 10 - FARINHAS, MASSAS ALIMENTÍCIAS, PRODUTOS PARA E DE PANIFICAÇÃO, (INDUSTRIALIZADOS E EMBALADOS) E SIMILARES.</b>					
b) massas alimentícias secas, com ou sem ovos, com ou sem recheio; massas alimentícias frescas, cruas e não fermentadas, com ou sem ovos, com ou sem recheio e cobertura, e similares, refrigerada.	$5 \times 10^3$	5	2	$10^3$	$5 \times 10^3$
c) produtos semielaborados, com ou sem recheio, com ou sem cobertura (pão de queijo, de batata e similares, pizza, pastéis), refrigerados e similares.	$5 \times 10^2$	5	2	$10^2$	$5 \times 10^2$
f) bolachas e biscoitos, sem recheio, com ou sem cobertura, incluindo pão de mel, cookies e similares.	$5 \times 10^2$	5	2	$10^2$	$5 \times 10^2$
g) bolachas e biscoitos, com recheio, com ou sem cobertura, incluindo pão de mel, cookies, alfajores e similares.	$10^3$	5	2	$5 \times 10^2$	$10^3$
n) granola e mistura de cereais não compactados, com ou sem adições, e similares.	$10^3$	5	2	$5 \times 10^2$	$10^3$

**Fonte:** BRASIL, 2001 (RDC ANVISA 012/2001). \*As categorias do grupo 10 ausentes na tabela não possuem especificações para estafilococos coagulase-positiva.

Dentre as categorias do grupo 10 apresentadas na Tabela 8, o alvo do estudo foi a categoria "b", que inclui massas alimentícias secas, com ou sem ovos, com ou sem recheio; massas frescas, cruas e não fermentadas, com ou sem ovos, com ou sem recheio e cobertura, e similares, refrigeradas. As amostras foram classificadas com base nesta definição (Tabela 9).

A seleção desta categoria foi motivada pela possível diversidade dos parâmetros físico-químicos que são reconhecidamente interferentes na multiplicação do gênero *Staphylococcus* (pH e  $a_w$ ) e, conseqüentemente, na produção de enterotoxinas, apesar de possuírem padrão microbiológico idêntico ( $M = 5 \times 10^3$ ).

**Tabela 9** – Tipos de produtos estudados e classificação das amostras por tipo de produto.

Produtos do item "b" da categoria 10 (RDC n2 12/2001 - ANVISA)	Tipo	Classificação das amostras Descrição
Massas alimentícias secas, com ou sem ovos, <b>sem recheio</b> .	1	Massa seca sem recheio (MSSR)
Massas alimentícias secas, com ou sem ovos, <b>com recheio</b> .	2	Massa seca com recheio (MSCR)
Massas alimentícias frescas cruas, não fermentadas, com ou sem ovos, <b>sem recheio</b> , sem cobertura, refrigeradas.	3	Massa fresca sem recheio (MFSR)
Massas alimentícias frescas cruas, não fermentadas, com ou sem ovos, <b>com recheio</b> , sem cobertura, refrigeradas.	4	Massa fresca com recheio (MFCR)

**Fonte:** Do autor (2013); extraído e adaptado da RDC ANVISA nº 012/2001.

As amostras perfizeram um total de 13 marcas diferentes, comercializadas em nível nacional, envolvendo 25 variedades, entre formatos e especificações, os quais estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10** – Marcas e variedades de produtos estudados.

MARCAS	VARIEDADES
A	macarrão seco - ave maria (n=1); alfabeto (n=1)
B	macarrão seco - espaguete (n=1); ave maria (n=1)
C	macarrão seco - padre nosso (n=1); concha (n=1); letrinhas (n=1); ave maria (n=1)
D	capeletti fresco c/ recheio de frango (n=1); ravioli fresco c/ recheio de carne (n=1); macarrão fresco - talharim (n=1)
E	macarrão fresco - talharim (n=1); nhoque fresco de batata s/ recheio (n = 6); ravioli fresco c/ recheio de carne (n = 2); capeletti fresco c/ recheio de frango (n=1); capeletti fresco c/ recheio 4 queijos (n = 2); capeletti fresco c/ recheio de carne (n=1); macarrão fresco - talharim (n=1); ravioli fresco c/ recheio de frango (n=1); ravioli fresco c/ recheio de carne (n=1); ravioli fresco c/ recheio de queijo (n=1); massa fresca p/ pastel (n=1)
F	macarrão seco - spirali (n=1)
G	macarrão seco - espaguete (n=1); caramujinho (n=1); argolinha (n=1)
H	macarrão seco - concha (n=1); tipo caseiro - talharim c/ ovos (n=1); capeletti seco c/ recheio de ricota e espinafre (n = 2); c/ recheio de carne (n = 4); c/ recheio de queijo (n = 2)
I	massa fresca p/ pastel (n=1)
J	massa fresca p/ pastel (n = 2)
K	macarrão seco - argola lisa (n=1)
L	macarrão seco - talharim c/ ovos (n=1)
M	massa fresca p/ pastel (n = 2); nhoque fresco de batata s/ recheio (n=1).

**Fonte:** Do autor, 2013

## 5.2 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CULTIVO

As 50 amostras de massas alimentícias utilizadas no estudo foram processadas no mesmo dia em que foram coletadas nos pontos de venda. As coletas ocorreram no período de junho a dezembro de 2012, em 4 pontos de vendas

distintos, pertencentes a redes de supermercados existentes na cidade de Londrina, PR. Em cada coleta foram adquiridos diferentes tipos e marcas, procurando-se evitar repetições. Todas as amostras estudadas encontravam-se dentro do prazo de validade informado pelo fabricante.

Alíquotas de 25g de cada amostra de alimento foram pesadas assepticamente e homogeneizadas com 225,0 mL de água peptonada 0,1% (SILVA et al., 2010). Após um período de 30 a 60 minutos sob refrigeração, as amostras foram submetidas à homogeneização em *stomacher* (Seward 400), em intensidade baixa por 60 segundos. Este intervalo mostrou-se necessário para evitar que massas secas pudessem perfurar a embalagem plástica estéril utilizada. A água peptonada foi mantida em temperatura de refrigeração até o momento do preparo das amostras. Diluições decimais, a partir da diluição  $10^{-1}$ , foram preparadas em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%.

### 5.3 CONTAGEM DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA (ecp)

A contagem de ECP foi realizada segundo Siqueira (1995) e Silva et al. (2010). Alíquotas de 0,1 mL das diluições, preparadas conforme descrito no item 5.2, foram semeadas em ágar Baird-Parker e ágar Vogel e Johnson, em duplicata. As placas foram incubadas a 35 - 37 °C, e após 48 horas realizada a identificação e a contagem das colônias que apresentavam as características típicas e atípicas de *Staphylococcus* spp. Em meio de cultivo Agar Baird-Parker essas colônias apresentam-se negras, lustrosas, convexas, rodeadas por halo claro, e em meio de cultivo Agar Vogel e Johnson também mostravam-se negras, pequenas e com halo amarelo.

### 5.4 PROVAS DE CONFIRMAÇÃO BIOQUÍMICA

Três colônias características obtidas em cada uma das placas, conforme descrito por Siqueira (1995), foram semeadas em placas contendo ágar Manitol Salgado

(7,5% de NaCl), e incubadas a 35 - 37 °C por pelo menos 24 horas. Quando o número de colônias características era inferior a 3 (três), todas as colônias foram semeadas neste meio.

Paralelamente, as colônias foram transferidas para um tubo com 3 a 5 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), incubado a 35 - 37 °C por 18 - 24 horas para a prova de coagulase. Após o período de incubação, uma alíquota de 0,5 mL da suspensão obtida foi transferida para um tubo, ao qual foram adicionados 0,5 mL de plasma de coelho liofilizado (Laborclin) reconstituído de acordo com as instruções do fabricante. os tubos foram incubados a 35-37 °C, e observados de hora em hora, por até 4 horas, mantendo-os por até 24 horas em incubação. Apenas as reações de nível 3 ou 4 foram consideradas confirmativas da presença de ECP. os resultados obtidos foram tabulados e comparados com os padrões estabelecidos na legislação brasileira para massas alimentícias ( $M = 5 \times 10^3$  UFC/g). As unidades formadoras de colônias de ECP por grama de alimento (UFC/g) foram resultantes do número de colônias fermentadoras de manitol e produtoras de coagulase, considerando-se a diluição correspondente.

#### 5.5 DETERMINAÇÃO DO PH

As amostras foram fragmentadas para proporcionar melhor homogeneização. Pesou-se 10 g da amostra em um béquer e diluiu-se em 100 mL de água. o conteúdo foi agitado até que as partículas, ficassem uniformemente suspensas, e o pH foi medido com o aparelho previamente calibrado (Hanna Instruments HI 3221), operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante (ZANEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). Os resultados apresentados correspondem às médias das medições realizadas em duas alíquotas derivadas de cada amostra.

#### 5.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA ( $A_w$ )

As amostras foram fragmentadas para que fosse possível preencher completamente o fundo do recipiente do equipamento. A atividade de água ( $a_w$ ) de cada amostra foi determinada individualmente, utilizando medidor de atividade de água (Aqua Lab Dew Point 4TEV). os resultados apresentados correspondem à média das medições realizadas em duas alíquotas derivadas de cada amostra.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores médios de pH e  $a_w$  obtidos para cada tipo de produto estudado (Massa seca sem recheio, Massa seca com recheio, Massa fresca sem recheio e Massa fresca com recheio) foram comparados, utilizando análise de variância e o teste de médias (teste de Tukey,  $P < 0,05$ ). As análises foram realizadas utilizando o *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e a planilha eletrônica Microsoft® Excel® 2010, versão 14.0.6112.5000 (32 bits) (Microsoft Corporation, Pasadena, CA, USA).

## **6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados, a discussão e as conclusões deste trabalho são apresentados na forma de artigo científico, o qual deverá ser submetido à avaliação de periódico para a sua publicação.

## 6.1 ARTIGO CIENTÍFICO

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA ESTABELECIDO PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA MASSAS ALIMENTÍCIAS.**

RESTA, M. S. A.; OLIVEIRA, T. C. R. M. de. **Avaliação do padrão estafilococos coagulase positiva estabelecido pela legislação brasileira para massas alimentícias.** Londrina, PR, Brasil, 2013.

**RESUMO:** O objetivo deste trabalho foi discutir o padrão estafilococos coagulase positiva (ECP) para massas alimentícias, estabelecido pela RDC n.º 12 de 2001 da ANVISA, baseando-se nos resultados de atividade de água ( $a_w$ ), potencial hidrogeniônico (pH) e contagem de ECP. Cinquenta amostras de 25 tipos de massas de treze marcas diferentes foram analisadas. A contagem de ECP de todas as amostras foi menor que 10 UFC/g, inferior a  $5,0 \times 10^3$  UFC/g, estabelecido pela legislação. A média de  $a_w$  das massas frescas foi de 0,96. As médias de  $a_w$  das massas secas com e sem recheio variaram entre 0,70 e 0,61, respectivamente, o que impossibilita a multiplicação de ECP e produção de toxina. A legislação brasileira poderia utilizar a  $a_w$  como parâmetro para determinar em quais tipos de massas o padrão ECP deveria ser pesquisado. A ausência de células viáveis de *Staphylococcus* spp. não assegura que o produto esteja livre de enterotoxinas. A implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na cadeia de produção de massas alimentícias é essencial para obtenção de produtos inócuos, uma vez que a detecção de enterotoxinas nos alimentos é inviável, devido ao alto custo.

**Palavras-chave:** Regulamentação. Atividade de água. pH. *Staphylococcus* spp. Enterotoxina.

**ABSTRACT:** The aim of this study was to discuss the coagulase-positive staphylococci (ECP) count limit for pasta, established by RDC no 12, 2001, ANVISA, based on the results of water activity ( $a_w$ ), hydrogenionic potential (pH) and ECP count. Fifty samples of 25 types of pasta from 13 different brands were analyzed. The ECP count of all analyzed samples was less than 10 CFU/g, below the limit of  $5.0 \times 10^3$  CFU/g, established by the Brazilian Legislation. The  $a_w$  average for fresh pasta was 0.96. The  $a_w$  average for dry pasta with and without stuffing varied between 0.70 and 0.61, respectively, which prevents the growth of ECP and toxin production. Brazilian legislation could use  $a_w$  as a parameter to determine in which kinds of pasta ECP count should be done. The absence of viable cells of *Staphylococcus* spp. does not ensure that the product is not contaminated with enterotoxin. The implementation of Good Manufacturing Practices (GMP) and the System of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) in the pasta production line is essential for obtaining safe products, since the detection of enterotoxins in food is unfeasible due to the high cost.

**Key words:** Food regulations. Water activity. pH. *Staphylococcus* spp. Enterotoxin.

### 6.1.1 Introdução

Mais de treze milhões de toneladas de massas alimentícias são produzidas anualmente por mais de quarenta e cinco países (IPO, 2012). O Brasil ocupa a terceira posição de maior produtor e consumidor em volume, atrás apenas da Itália e dos Estados Unidos. Em 2011, cerca de 1,3 milhão de toneladas foi produzido internamente, e mais de 8 mil toneladas foram exportadas (ABIMA, 2012). Em 2012, o consumo interno de massas alimentícias no Brasil foi de aproximadamente 1,2 milhões de toneladas, o que colocou o Brasil apenas em vigésimo segundo lugar no consumo per capita desse produto (cerca de 6,2 Kg/ano) (IPO, 2012).

A RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005, da ANVISA, atualmente em vigor no Brasil, não estabelece o padrão de identidade e qualidade das massas alimentícias, que anteriormente era regulamentado pela Resolução RDC nº 93, de 31 de outubro de 2000, da ANVISA (BRASIL, 2005). Essa resolução trazia, entre outras, características sensoriais, físicas, químicas e físico-químicas para esta categoria de produtos (BRASIL, 2000). A RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da ANVISA estabelece os padrões microbiológicos para os alimentos em geral, e é a única referência nacional para a avaliação das condições microbiológicas de alimentos no Brasil (BRASIL, 2001). Os padrões microbiológicos para massas alimentícias incluem limites para *Bacillus cereus* ( $5 \times 10^3$  UFC/g), Coliformes a 45 °C ( $10^2$  UFC/g), *Salmonella* sp. (Ausência em 25 g) e Estafilococos Coagulase Positiva ( $5 \times 10^3$  UFC/g) (BRASIL, 2001). Dentre os padrões estabelecidos destaca-se o de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) pelo limite máximo de contagem adotado ( $M = 5 \times 10^3$  UFC/g). A forma como foram agrupados os produtos também chama a atenção porque todos os tipos de massa foram incluídos em uma mesma categoria, independente de suas características distintas (secas, frescas, conservadas sob refrigeração, com ou sem recheio, entre outras).

A contagem de ECP é reconhecida internacionalmente como um padrão microbiológico de segurança de alimentos e importante indicador das condições higiênico-sanitárias da sua produção e conservação. A sua relação com as condições higiênico-sanitárias dos alimentos está ligada ao fato de que o principal reservatório natural de *Staphylococcus aureus* é o ser humano, seja na pele,

mucosas, e principalmente no trato naso-faríngeo de portadores assintomáticos (TONDO; BARTZ, 2012).

A intoxicação estafilocócica ocorre devido à ingestão de alimentos contaminados com enterotoxinas termoestáveis produzidas, principalmente por *S. aureus*. A produção das enterotoxinas é influenciada por vários fatores intrínsecos do alimento, tais como tamanho do inóculo inicial, competição da microbiota, pH, concentração de cloreto de sódio e atividade de água, assim como pela temperatura de armazenamento (JAY, 2005).

Apesar da exigência da legislação e do expressivo desempenho brasileiro no mercado mundial de massas alimentícias, pouco tem se estudado sobre este tipo de produto antes do seu preparo, principalmente no que diz respeito aos seus padrões microbiológicos. O objetivo do presente trabalho foi discutir o padrão ECP estabelecido pela RDC nº 12/2001 - ANVISA para massas alimentícias com base nos resultados da análise de amostras de marcas variadas, coletadas em diversos pontos de venda. Valores de atividade de água ( $a_w$ ) e de potencial hidrogeniônico (pH) foram determinados com a finalidade de se obter subsídios para justificar ou contestar o referido padrão microbiológico.

## 6.1.2 Material e Métodos

### 6.1.2.1 Amostragem

O grupo 10 de alimentos descrito na RDC nº 12/2001 da ANVISA é subdividido em 13 categorias diferentes, enumerados de "a" a "n". As amostras analisadas neste trabalho foram da categoria "b", a qual inclui massas alimentícias secas, com ou sem ovos, com ou sem recheio; massas frescas, cruas e não fermentadas, com ou sem ovos, com ou sem recheio e cobertura, e similares, refrigeradas.

As 50 amostras de massas alimentícias analisadas foram processadas no mesmo dia em que foram coletadas nos pontos de venda. As coletas ocorreram no período de junho a dezembro de 2012, em 4 pontos de vendas distintos, pertencentes a redes de supermercados existentes na cidade de Londrina, PR. Em cada coleta foram adquiridos diferentes tipos e marcas, procurando-se evitar

repetições. Treze marcas diferentes, envolvendo 25 variedades de massas alimentícias entre formatos e especificações foram analisadas (Tabela 11).

**Tabela 11 – Marcas e variedades de produtos estudados.**

MARCAS	VARIETADES
A	macarrão seco - ave maria (n=1); alfabeto (n=1)
B	macarrão seco - espaguete (n=1); ave maria (n=1)
C	macarrão seco - padre nosso (n=1); concha (n=1); letrinhas (n=1); ave maria (n=1)
D	capeletti fresco c/ recheio de frango (n=1); ravioli fresco c/ recheio de carne (n=1); macarrão fresco - talharim (n=1)
E	macarrão fresco - talharim (n=1); nhoque fresco de batata s/ recheio (n = 6); ravioli fresco c/ recheio de carne (n = 2); capeletti fresco c/ recheio de frango (n=1); capeletti fresco c/ recheio 4 queijos (n = 2); capeletti fresco c/ recheio de carne (n=1); macarrão fresco - talharim (n=1); ravioli fresco c/ recheio de frango (n=1); ravioli fresco c/ recheio de carne (n=1); ravioli fresco c/ recheio de queijo (n=1); massa fresca p/ pastel (n=1)
F	macarrão seco - spirali (n=1)
G	macarrão seco - espaguete (n=1); caramujinho (n=1); argolinha (n=1)
H	macarrão seco - concha (n=1); tipo caseiro - talharim c/ ovos (n=1); capeletti seco c/ recheio de ricota e espinafre (n = 2); c/ recheio de carne (n = 4); c/ recheio de queijo (n = 2)
I	massa fresca p/ pastel (n=1)
J	massa fresca p/ pastel (n = 2)
K	macarrão seco - argola lisa (n=1)
L	macarrão seco - talharim c/ ovos (n=1)
M	massa fresca p/ pastel (n = 2); nhoque fresco de batata s/ recheio (n=1).

**Fonte:** Do autor, 2013

#### 6.1.2.2 Preparo das amostras para cultivo

Alíquotas de 25 g de cada amostra de alimento foram pesadas assepticamente e homogeneizadas com 225,0 mL de água peptonada 0,1% (SILVA et al., 2007). Após um período de 30 a 60 minutos sob refrigeração, as amostras foram submetidas à homogeneização em stomacher (Seward 400), em intensidade baixa por 60 segundos. Diluições decimais, a partir da diluição  $10^{-1}$ , foram preparadas em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1% estéril.

#### 6.1.2.3 Contagem de estafilococos coagulase positiva

Alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em ágar Baird-Parker e ágar Vogel e Johnson, em duplicata. As placas foram incubadas a 35 - 37 °C, e após 48 horas realizada a identificação e a contagem das colônias que apresentavam as características típicas e atípicas de *Staphylococcus* spp. Em meio

de cultivo Agar Baird-Parker essas colônias apresentam-se negras, lustrosas, convexas, rodeadas por halo claro, e em meio de cultivo Agar Vogel-Johnson também mostravam-se negras, pequenas e com halo amarelo (SIQUEIRA, 1995; SILVA et al., 2007; BENNET; LANCETTE, 2001).

Três colônias características obtidas em cada uma das placas, conforme descrito por Siqueira (1995), foram semeadas em placas contendo ágar Manitol Salgado (7,5% de NaCl), e incubadas a 35 - 37 °C por pelo menos 24 horas. Quando o número de colônias características era inferior a 3 (três), todas as colônias foram semeadas neste meio. Paralelamente, as colônias foram transferidas para um tubo com 3 a 5 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), incubado a 35 - 37 °C por 18 - 24 horas para a prova de coagulase. Após o período de incubação, uma alíquota de 0,5 mL da suspensão obtida foi transferida para um tubo, ao qual foram adicionados 0,5 mL de plasma de coelho liofilizado (Laborclin) reconstituído de acordo com as instruções do fabricante. A leitura da prova foi realizada após 4 a 24 horas de incubação a 35 - 37 °C (SILVA et al., 2007). As unidades formadoras de colônias de ECP por grama de alimento (UFC/g) foram resultantes do número de colônias fermentadoras de manitol e produtoras de coagulase, considerando-se a diluição correspondente.

#### 6.1.2.4 Determinação do pH

As amostras foram trituradas e um total 10 g da amostra pesado em um béquer. Após a adição de 100 mL de água, o conteúdo foi agitado até que as partículas, ficassem uniformemente suspensas, e o pH foi medido com o aparelho previamente calibrado (Hanna Instruments HI 3221), operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante (ZANEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). Os resultados apresentados foram correspondentes às médias das medições realizadas em duas alíquotas derivadas de cada amostra.

#### 6.1.2.5 Determinação da atividade de água ( $a_w$ )

As amostras foram fragmentadas para permitir que o fundo do recipiente apropriado ao equipamento pudesse ser completamente preenchido. A atividade de água ( $a_w$ ) de cada amostra foi determinada individualmente, utilizando

medidor de atividade de água (Aqua Lab Dew Point 4TEV). Os resultados apresentados foram correspondentes à média das medições realizadas em duas alíquotas derivadas de cada amostra.

#### 6.1.2.6 Análise estatística

Os valores médios de pH e  $a_w$  obtidos para cada tipo de produto estudado (Massa seca sem recheio, Massa seca com recheio, Massa fresca sem recheio e Massa fresca com recheio) foram comparados, utilizando análise de variância e o teste de médias (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e a planilha eletrônica Microsoft® Excel® 2010, versão 14.0.6112.5000 (32 bits) (Microsoft Corporation, Pasadena, CA, USA).

#### 6.1.3 Resultados

Todas as 50 amostras de massas alimentícias analisadas apresentaram contagem de ECP menor do que 10 UFC/g, portanto abaixo do limite estabelecido pela Resolução RDC n° 12/2001, da ANVISA, que é de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g (BRASIL, 2001).

As médias de  $a_w$  das amostras analisadas neste trabalho são apresentadas na Tabela 12. Os valores de  $a_w$  encontrados não apresentaram diferença significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ) entre as médias calculadas para as massas frescas, independente da presença de recheio ( $0,96 \pm 0,02$ ). As massas secas com e sem recheio apresentaram médias de  $a_w$  significativamente diferentes entre si e entre as massas secas sem recheio ( $0,61 \pm 0,02$ ) e com recheio ( $0,70 \pm 0,02$ ).

**Tabela 12** – Médias de  $a_w$  das amostras analisadas por tipo de produto.

TIPO DE PRODUTO	NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS	MÉDIAS DE $a_w$
Massa seca SEM recheio	16	0,61 <sup>c</sup> ± 0,07
Massa seca COM recheio	8	0,70 <sup>b</sup> ± 0,03
Massa fresca SEM recheio	14	0,96 <sup>a</sup> ± 0,02
Massa fresca COM recheio	12	0,96 <sup>a</sup> ± 0,01

**Fonte:** Do autor (2013). Médias assinaladas com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As médias de pH das amostras estão apresentadas na Tabela 13. Os valores de pH encontrados variaram entre  $5,69 \pm 0,43$  e  $6,12 \pm 0,23$ . As massas frescas sem recheio apresentaram média significativamente menor do que as massas com recheio ( $5,69 \pm 0,43$ ), tanto as secas quanto as frescas, mas semelhante à média das massas secas sem recheio ( $5,79 \pm 0,23$ ) (Tukey,  $p < 0,05$ ).

**Tabela 13** – Médias de pH das amostras analisadas por tipo de produto.

TIPO DE PRODUTO	NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS	MÉDIAS DE pH
Massa seca SEM recheio	16	$5,79^{a,b} \pm 0,23$
Massa seca COM recheio	8	$6,12^a \pm 0,23$
Massa fresca SEM recheio	14	$5,69^b \pm 0,43$
Massa fresca COM recheio	12	$6,03^a \pm 0,15$

**Fonte:** Do autor (2012). Médias assinaladas com letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

As legislações internacionais pertinentes que foram pesquisadas (Argentina, Austrália, Canadá, Quênia, Nova Zelândia, Europa e EUA) mostraram-se divergentes, tornando a comparação entre elas e a legislação brasileira pouco significativa. Um claro exemplo desta divergência foi observado ao se comparar a legislação europeia, que não estabelece limite de ECP para massas alimentícias, e a legislação do Quênia, que determina como critério a ausência de ECP para este tipo de produto.

#### 6.1.4 Discussão

A contagem de ECP das 50 amostras analisadas neste trabalho foi menor que 10 UFC/g. Swartzentruber et al. (1982) também encontraram baixa contaminação por ECP ( $<3$  NMP), após análise de 1607 amostras de macarrão seco e 1477 amostras de "noodles" seco. Outros autores, que avaliaram massas frescas recheadas ou não, comercializadas no Brasil, encontraram diferentes níveis de contaminação por ECP. Comelli et al. (2011) analisaram um total de 40 amostras de massas alimentícias refrigeradas industrializadas (24 amostras) e caseiras (16 amostras) e encontraram 3 amostras (2 industrializadas e 1 caseira) com contagens acima de  $10^2$  UFC/g. Por outro lado, em um estudo realizado com massas frescas produzidas e comercializadas em Londrina, pR, Brasil, todas as amostras analisadas

estavam contaminadas com ECP, algumas com contagens superiores a  $5,0 \times 10^3$  UFC/g (FERRARI; WINKLER; OLIVEIRA, 2007).

A atividade de água ( $a_w$ ) e o pH são características intrínsecas dos alimentos que interferem no desenvolvimento microbiano (JAY, 2005; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010) e, por conseguinte, na produção de seus metabólitos, como as enterotoxinas produzidas por isolados enterotoxigênicos de *Staphylococcus* spp. Contagens acima de  $10^3$  UFC de ECP indicam condições higiênicas sanitárias inadequadas de processamento. Contagens acima de  $10^5$  UFC de *Staphylococcus* spp. enterotoxigênicos por grama de alimento são necessárias para haver produção de enterotoxina em quantidade suficiente para causar intoxicação alimentar.

O pH das massas alimentícias estudadas no presente trabalho variou de 5,69 a 6,12. Embora ECP possa se multiplicar em pH igual ou superior a 4,2 (ZINK; BOHM, 2005; JAY, 2005), outras características intrínsecas relevantes, como por exemplo a  $a_w$ , devem ser consideradas. Valores de  $a_w$  abaixo de 0,86 são limitantes ao desenvolvimento de *Staphylococcus* spp. (GAVA, 1984; SIQUEIRA, 1995; JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008). No presente trabalho, as médias de  $a_w$  obtidas para massas secas com e sem recheio foram abaixo desse limite (0,70 e 0,61, respectivamente). A necessidade de se investigar a ocorrência de ECP nesse produto torna-se questionável, já que nestas condições, a multiplicação de ECP fica comprometida e a produção de toxina estafilocócica pouco provável. Por outro lado, a média de  $a_w$  para massas frescas com e sem recheio foi de 0,96. A legislação brasileira, portanto, poderia utilizar a umidade ou  $a_w$  como parâmetro para determinar em quais tipos de massas o padrão ECP deveria ser pesquisado, ou seja, aplicável apenas para massas alimentícias cruas que apresentassem condições favoráveis à multiplicação de *Staphylococcus* spp. e à produção de suas enterotoxinas ( $a_w > 0,86$ ).

Embora a média de  $a_w$  das massas frescas com e sem recheio, obtida neste trabalho, possibilite a multiplicação de *Staphylococcus* spp., todas as amostras analisadas, apresentaram contagens de ECP menores que 10 UFC/g, o que indicou condições adequadas de processamento e armazenamento das massas alimentícias analisadas. A indústria de massas brasileira nos últimos anos investiu em tecnologia, equipamentos de última geração e capacitação dos profissionais, resultando em um parque industrial entre os mais modernos do mundo

(ABIMA,2012). Os controles estabelecidos na cadeia de produção diminuem o risco de contaminação e a posterior multiplicação de ECP, o que leva, conseqüentemente, à diminuição do risco da presença de enterotoxinas estafilocócicas neste tipo de produto. Além disso, outros fatores intrínsecos e extrínsecos são considerados para o armazenamento desses produtos, de forma a constituir barreiras à contaminação e multiplicação de ECP. As massas frescas possuem conservantes e aditivos em suas formulações, algumas possuem embalagens com atmosfera modificada, são comercializadas sob refrigeração (4 a 10 °C) e, em geral, apresentam curto prazo de validade (30 a 120 dias).

É muito importante ressaltar que a ausência de células viáveis de *Staphylococcus* spp. no momento da análise do produto final não assegura que o produto esteja livre de enterotoxinas estafilocócicas, devido à sua termoestabilidade (LANCETTE; BENNET, 2001). Somente a detecção de enterotoxinas no produto final poderia contestar a sua inocuidade definitivamente. A detecção de enterotoxinas diretamente nos alimentos é inviável de ser utilizada na rotina laboratorial devido ao seu alto custo. É essencial, portanto, o controle de toda a cadeia de produção na produção de massas alimentícias através da implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

A legislação europeia (Regulamento CE N° 2073/2005) não estabelece critérios para o padrão ECP em massas alimentícias, e não foram encontradas informações sobre este tipo de critério para o referido produto nos *websites* de órgãos oficiais dos Estados Unidos (FDA, USDA). O padrão para ECP estabelecido na Austrália, Argentina, Canadá e Nova Zelândia varia de  $10^3$  a  $10^4$  UFC/g. Embora a legislação desses países também estabeleça um único limite máximo, independente das diferenças de  $a_w$  existente entre os tipos de produtos, não é possível afirmar que nesses países tenha sido realizada uma avaliação de risco que possibilitasse saber se massas alimentícias cruas são associadas com frequência a casos ou surtos de intoxicação estafilocócica. No Brasil, não há informações disponíveis sobre a implicação de massas alimentícias cruas como responsáveis por veiculação de enterotoxinas estafilocócicas.

Um padrão microbiológico deveria ser estabelecido e aplicado quando há evidências de que o alimento poderia representar um risco à saúde pública ou após uma avaliação de risco. Além disso, esses padrões deveriam ser

revisados periodicamente a fim de manterem-se atualizados quanto a patógenos emergentes, tecnologias em desenvolvimento e novos conhecimentos científicos (CODEX ALIMENTARIUS, 1997).

O avanço tecnológico da indústria de massas alimentícias, que reduziu o contato do manipulador com o produto, da aplicação de embalagens com atmosfera modificada e uso de conservantes associados à conservação refrigerada, assim como, a baixa contaminação por ECP nas massas industrializadas encontrada neste trabalho, permitem conjecturar sobre a necessidade do estabelecimento desse padrão microbiológico, principalmente, para massas secas.

A partir dos resultados do presente trabalho pode-se inferir que é necessário a realização de análises laboratoriais sistemáticas dos produtos alimentícios produzidos no mercado interno para estabelecer padrões microbiológicos coerentes com as condições higiênico-sanitárias de processamento desses produtos.

#### 6.1.5 Conclusão

Todas as amostras de massas alimentícias secas e frescas analisadas apresentaram contagens de ECP menor que 10 UFC/g.

A média de  $a_w$  das massas secas com e sem recheio foi menor do que 0,70 e 0,61, respectivamente, o que impossibilita a multiplicação de ECP e a produção de toxina. A  $a_w$  poderia ser utilizada como parâmetro para determinar em quais tipos de massas o padrão ECP deveria ser pesquisado, uma vez que a média de  $a_w$  das massas frescas foi de 0,96.

A ausência de *Staphylococcus* spp. não assegura que a massa alimentícia não esteja contaminada com enterotoxina estafilocócica. Assim sendo, a implantação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na cadeia de produção de massas alimentícias torna-se essencial para obtenção de produtos inócuos, uma vez que a detecção de enterotoxinas nos alimentos é inviável, devido ao alto custo.

### 6.1.6 Referências

ABIMA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MASSAS ALIMENTÍCIAS. **Exportação - Massas brasileiras**. Disponível em: <<http://www.abima.com.br/estMassasBrasileiras.asp>>. Acesso em 02 jul. 2012.

ARGENTINA. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos e Tecnología Medica. **Código Alimentario Argentino**. Capítulo IX - Alimentos farináceos - cereales, harinas y derivados. Artículos: 643 al 766. Actualizado al 03/2013. Disponível em: <[http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_IX.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_IX.pdf)>. Acesso em: 22 mar. 2013.

AUSTRALIA. **Food Standards. Microbiological Limits for Foods. Guide to Standard 1.6.1 -Microbiological Limits for Food with additional guideline criteria**. Camberra, 2001. Disponível em: <[http://www.foodstandards.gov.au/\\_srcfiles/Micro\\_0801.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/Micro_0801.pdf)>. Acesso em 22 mar. 2013.

BENNET, R. W.; LANCETTE, G. A. **Staphylococcus aureus** In: BAM - Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 12, 2001. Disponível em: <<http://www.911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf>> Acesso em: 20 mar. 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 93, de 31 de outubro de 2000. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de massa alimentícia**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 01 de novembro 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 02 de janeiro 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n.º 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos**. Disponível em: <[http://www.abima.com.br/dload/13\\_45\\_resol\\_263\\_05\\_leg\\_alim\\_nac.pdf](http://www.abima.com.br/dload/13_45_resol_263_05_leg_alim_nac.pdf)>. Acesso em: 03 jul. 2012.

CANADA, Government of. **Interpretative Summary - Health products and food branch (HPFB) Standards and Guidelines for Microbiological Safety of Food**. Ottawa: Health products and food branch (HPFB), 2008.

CE - COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. **Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios**. Jornal Oficial da União Europeia. L 338/1, 31 dez. 2005.

CODEX ALIMENTARIUS. CAC/GL 21 - 1997 - **Principles for the establishment and application of microbiological criteria for food**. Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.org/download/standards/394/CXG\\_021e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/download/standards/394/CXG_021e.pdf)>. Acesso em 20 fev. 2013.

COMELLI, C.; CHIARINI, E.; PRADO, S. P. T.; OLIVEIRA, M. A. de; BERGAMINI, A. M. M. Avaliação microbiológica e da rotulagem de massas alimentícias frescas e refrigeradas comercializadas em feiras livres e supermercados. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v.22, n.2, p.251-258, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

FRANCO, B. D. G de M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERRARI, R. G., WINKLER, S. M., e OLIVEIRA, T. C. R. M. de. Avaliação microbiológica de alimentos isentos de registro no Ministério da Saúde. **Semina: Ciências Agrárias**, v.28, n.2, p.241-250, Londrina, 2007.

GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: NBL Editora, 1984. 284 p.

GIANNATALI, E. DI; PRENCIPE, V.; TONELLI, A.; MARFOGLIA, C.; MIGLIORATI, G. Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption. **Veterinaria Italiana**, v.47, n.2, p.165-173, 2011.

IPO - INTERNATIONAL PASTA ORGANISATION. **The world pasta industry in 2011**. Disponível em: <<http://www.internationalpasta.org/resources/extra/file/IPO%20AGM%202012/IPOreport2012fin2stat.pdf>>. Acesso em 07 dez. 2012.

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

KENYA. Technical Committee Representation. **Pasta products - Specification**. Nairobi: Kenya Bureau of Standards (KEBS), 2009.

Disponível em: <[http://members.wto.org/crnattachments/2010/tbt/ken/10\\_0458\\_00\\_e.pdf](http://members.wto.org/crnattachments/2010/tbt/ken/10_0458_00_e.pdf)>. Acesso em 22 mar. 2013.

LANCETTE, G. A.; TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VADRZANT, C. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

NEW ZEALAND. Ministry of Health. The Food Administration Section. Microbiological reference criteria for food. In: **Food Administration Manual**. Version 2.0. Wellington, 1995. Disponível em: <[http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/microbiological\\_reference\\_guide\\_assess.pdf](http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/microbiological_reference_guide_assess.pdf)>. Acesso em: 22 mar. 2013.

SANTANA, E.H.W. de; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C., MENDONÇA, M.B.O.C. de. Estafilococos em alimentos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela Editora, 2007.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. p.73-153.

SWARTZENTRUBER, A; PAYNE, W. L.; WENTZ, B. A.; BARNARD, R. J.; READ JR., R. B. Microbiological quality of macaroni and noodle products obtained at retail markets. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.03, p.540-543, 1982.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2012. 263 p.

WOOLAWAY, M. C.; BARTLETT, C. L.; WIENEKE, A. A. International outbreak of staphylococcal food poisoning caused by contaminated lasagna. **The Journal of Hygiene**, v.96, n.1, p.67-73, 1986.

ZANEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

ZINK, D.; BOHM, S. B. **Potentially hazardous food: the evolving definition of temperature control for safety**. 2005. Disponível em:  
<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodborneIllnessandRiskFactorReduction/RetailFoodRiskFactorStudies/cm11132.htm>>. Acesso em: 01 fev. 2013.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE MASSAS ALIMENTÍCIAS. **Exportação - Massas brasileiras**. Disponível em: <<http://www.abima.com.br/estMassasBrasileiras.asp>>. Acesso em 02 jul. 2012a.

\_\_\_\_\_. **Estatísticas - Mercado mundial de massas**. Disponível em: <<http://www.abima.com.br/estMercMundMassas.asp>>. Acesso em 02 jul. 2012b.

\_\_\_\_\_. **Estatísticas - Mercado nacional de massas**. Disponível em: <<http://www.abima.com.br/estMercNacMassas.asp>>. Acesso em 02 jul. 2012c.

ACCO, M.; FERREIRA, F. S.; HENRIQUES, J. A. P.; TONDO, E. C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v.20, n.5, p. 489-493, 2005.

ARGENTINA. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos e Tecnologia Medica. **Código Alimentario Argentino**. Capítulo IX - Alimentos farináceos - cereales, harinas y derivados. Artículos: 643 al 766. Actualizado al 03/2013. Disponível em: <[http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO\\_IX.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/CAPITULO_IX.pdf)>. Acesso em: 22 mar. 2013.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v.2, n.8, p. 1751-1773, 2010.

AUSTRALIA. Food Standards. **Microbiological Limits for Foods. Guide to Standard 1.6.1 -Microbiological Limits for Food with additional guideline criteria**. Camberra, 2001. Disponível em: <[http://www.foodstandards.gov.au/\\_srcfiles/Micro\\_0801.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/Micro_0801.pdf)>. Acesso em 22 mar. 2013.

BANWART, G. J. Factors that affect microbial growth in food. In: **Basic Food Microbiology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 773 p.

BENNET, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus* In: **BAM - Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 12, 2001. Disponível em: <<http://www.911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf>> Acesso em: 20 mar. 2013.

BENNETT, R.W., YETERIAN, M., SMITH, W., COLES, C. M., SASSAMAN, M. e MCCLURE, F.D. *Staphylococcus aureus* identification characteristics and enterotoxigenicity. **Journal of Food Science**, Maryland, v.51, n.5, p.1337-1339, 1986.

BERGERON, M.; DAUWALDER, O.; GOUY, M.; FREYDIERE, A.- M.; BES, M.; MEUGNIER H.; BENITO, Y.; ETIENNE, J.; LINA G.; VANDENESCH, F. e BOISSET, S. Species identification of staphylococci by amplification and sequencing of the *tuf* gene compared to the *gap* gene and by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **European Journal of Clinical Microbiological Infective Diseases**, Springer-Verlag, n.30, 343-354, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n° 62: Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.** Brasília, 26 de Agosto de 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n° 1.480/MS, de 31 de dezembro de 1990. Aprova o regulamento técnico para controle de produtos absorventes.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1480\\_90.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/1480_90.htm)>. Acesso em: 29 ago. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n°. 93, de 31 de outubro de 2000. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de massa alimentícia.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 01 de novembro 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n°. 12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 02 de janeiro 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Deteção e Identificação de Bactérias de Importância Médica - Módulo V,** 2004. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf)> Acesso em: 28 ago. 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n° 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos.** Disponível em: <[http://www.abima.com.br/dload/13\\_45\\_resol\\_263\\_05\\_leg\\_alim\\_nac.pdf](http://www.abima.com.br/dload/13_45_resol_263_05_leg_alim_nac.pdf)>. Acesso em: 03 jul. 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados Epidemiológicos -DTA: Período de 2000 a 2011\***, 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_dta\\_periodo\\_2000\\_2011\\_site.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_periodo_2000_2011_site.pdf)> Acesso em: 17 out. 2012.

CANADA, Government of. **MFHPB-21 - Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Food.** Ottawa: Health products and food branch (HPFB), 2005.

\_\_\_\_\_. **Interpretative Summary - Health products and food branch (HPFB) Standards and Guidelines for Microbiological Safety of Food.** Ottawa: Health products and food branch (HPFB), 2008.

CARMO, L.S.; DIAS, R. S; ANUNCIAÇÃO, L. L. C; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State (Brazil). **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, Belo Horizonte, v.47, n.2, p.113-122, 1995.

CDC - CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC Surveillance Summaries**, March 17, 2000. MMWR 2000; 49 (No. SS-1).

CE - COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. Regulamento (CE) n° 2073/2005 da Comissão, de 15 de Novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**. L 338/1, 31 dez. 2005.

CEN - EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARTIZATION. **EN ISO 6888-1 - Microbiology of food and animal food stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium**. Brussels: Central Secretariat, 1999.

CHAPMAN, George H. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. **Journal of Bacteriology**. Washington, v.50, n.2, p.201-203, 1945. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374126/>>. Acesso em: 20 mar 2013.

CODEX ALIMENTARIOS. **CAC/GL 21 - 1997 - Principles for the establishment an application of microbiological criteria for food**. Disponível em: <[http://www.codexalimentarius.org/download/standards/394/CXG\\_021e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/download/standards/394/CXG_021e.pdf)>. Acesso em 20 fev. 2013.

COMELLI, C.; CHIARINI, E.; PRADO, S. P. T.; OLIVEIRA, M. A. de; BERGAMINI, A. M. M. Avaliação microbiológica e da rotulagem de massas alimentícias frescas e refrigeradas comercializadas em feiras livres e supermercados. **Alimentação e Nutrição**, Araraquara, v.22, n.2, p.251-258, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DENDY, D. A. V.; DOBRASZCZYK, B. J. **Cereals and Cereals Products: Chemistry and Technology**. Reino Unido: Aspen, 2001.

DERZELLE, S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M.; DEPERROIS, V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. **Food Microbiology**, v.26, n.8, p. 896-904, 2009

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Factors that influence microbial growth. In: **Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/scienceresearch/researchareas/safepacticesforfoodproceses/u cm094145.htm>>. Acesso em 15 fev. 2013.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602 p.

FERRARI, R. G., WINKLER, S. M., e OLIVEIRA, T. C. R. M. de. Avaliação microbiológica de alimentos isentos de registro no Ministério da Saúde. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.28, n.2, p.241-250, 2007.

FRANCO, B. D. G de M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FRANK, A. A.; SOARES, E. A. **Nutrição ao envelhecer**. São Paulo: Atheneu, 2005. 288 p. GAVA, Altair Jaime. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: NBL Editora, 1984. 284 p.

GIANNATALI, E. DI; PRENCIPE, V.; TONELLI, A.; MARFOGLIA, C.; MIGLIORATI, G. Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food for human consumption. **Veterinaria Italiana**, v.47, n.2, p.165-173, 2011.

GUERREIRO, Lilian. **Dossiê Técnico - Massas Alimentícias**. Rio de Janeiro: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. REDETEC - Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2006. Disponível em < <http://www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MjY=>>. Acesso em 20 mar 2013.

HPA - HEALTH PROTECTION AGENCY. **Staphylococcus aureus food poisoning reported to the Health Protection Agency Centre for Infections England and Wales, 1992-2006**. Disponível em:<<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/StaphylococcusAureus/FoodPoisoning/EpidemiologicalData>>. Acesso em: 21 mar. 2013.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods/ Microorganisms in Foods - V. 5 - **Microbiological Specifications of Foods Pathogens** - Blackie Academic and Professional, 1996.

IPO - INTERNATIONAL PASTA ORGANISATION. **The world pasta industry in 2011**. Disponível em: <<http://www.internationalpasta.org/resources/extra/file/IPO%20AGM%202012/IPOreport2012fin2stat.pdf>>. Acesso em 07 dez. 2012.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6th. ed. Gaithersburg: Aspen, 2000.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6a. edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KENYA. Technical Committee Representation. **Pasta products - Specification**. Nairobi: Kenya Bureau of Standards (KEBS), 2009. Disponível em: < [http://members.wto.org/crnattachments/2010/tbt/ken/10\\_0458\\_00\\_e.pdf](http://members.wto.org/crnattachments/2010/tbt/ken/10_0458_00_e.pdf)>. Acesso em: 22 mar. 2013.

LANCETTE, G.A.; BENNET, R. W. **Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxins**. In: DOUNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001.

LANCETTE, G. A.; TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VADRZANT, C. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1992.

NASCIMENTO, J. dos S., JUNQUEIRA, A. R., FLEMING, L. R., SAMPAIO, L. da S. Estafilococos coagulase positiva em saladas de restaurantes *self-service* da cidade do Rio de Janeiro. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, 2009.

NEW ZEALAND. Ministry of Health. The Food Administration Section. Microbiological reference criteria for food. In: **Food Administration Manual**. Version 2.0. Wellington, 1995. Disponível em:

<[http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/microbiological\\_reference\\_guide\\_assess.pdf](http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/microbiological_reference_guide_assess.pdf)> Acesso em: 22 mar. 2013.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO, Nepa. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos: versão 2**. 4- Ed., 2011. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela&PHPSESSID=9a6257fb75de90160e22d33c2b9e1fc7>>. Acesso em: 03 jul. 2012.

OMOE, K.; HU, D-L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHAINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in ***Staphylococcus aureus*** isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v.246, n. 2, p.191-198, 2005.

PIETROWSKI, G. de A. M., RANTHUM, M., CROZETA, T. e JONGE, V. de. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo mussarela comercializado na cidade de Ponta Grossa, Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v.2, n.2, p.25- 31, 2008.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins**, v.2, n.8, p.2177-2197, 2010.

PINTO, B., CHENOLL, E., AZNAR, R. Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, n.?, p.340- 352, 2005.

PRICE, Robert J. **Compendium of fish and fishery product processing methods, hazards and controls**. [S. l.]: National Seafood HACCP Alliance for Training and Education, 1997.

SANTANA, E.H.W. de; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C., MENDONÇA, M.B.O.C. de. Artigo de Revisão - Estafilococos em alimentos. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela Editora, 2007.

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

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. p.73-153.

SOUTH AFRICA. Minister of Health. **Regulations governing microbiological standards for foodstuffs and related matters**. Government Notice n° R. 692, 16 may 1997.

SPERBER, W.H. e TATINI, S. R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, Washington, v.29, n.4, p.502-505, 1975.

SWARTZENTRUBER, A; PAYNE, W. L.; WENTZ, B. A.; BARNARD, R. J.; READ JR., R. B. Microbiological quality of macaroni and noodle products obtained at retail markets. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.03, p.540-543, 1982.

TIBANA, A.; RAYMAN, K.; AKHTAR, M.; SZABO, R. Thermal stability of staphylococcal enterotoxins A, B and C in a buffered system. **Journal of Food Protection**, v.50, n.03, p.239- 242, 1982.

TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2012. 263 p.

UNTERMANN, Friedrich; MÜLLER, Christoph. Influence of  $a_w$  value and storage temperature on the multiplication and enterotoxin formation of staphylococci and dry-cured raw hams. **International Journal of Food Microbiology**, v.16, n.01, p.109-115, 1992.

WOOLAWAY, M. C.; BARTLETT, C. L.; WIENEKE, A. A. International outbreak of staphylococcal food poisoning caused by contaminated lasagna. **The Journal of Hygiene**, v.96, n.1, p.67-73, 1986.

ZANEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

ZINK, D.; BOHM, S. B. **Potentially hazardous food: the evolving definition of temperature control for safety**. 2005. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/RetailFoodProtection/FoodborneIllnessandRiskFactorReduction/RetailFoodRiskFactorStudies/ucm11132.htm>>. Acesso em: 01 fev. 2013.