

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MARIANA DE QUADROS FREITAS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DO CHURRASCO GAÚCHO**

**Uruguaiiana
2018**

MARIANA DE QUADROS FREITAS

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DO CHURRASCO GAÚCHO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Farmácia da Universidade Federal
do Pampa, como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora : Prof^a Dr^a Cheila D. O. Stopiglia

**Uruguaiiana
2018**

Mariana de Quadros Freitas

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DO CHURRASCO GAÚCHO**


Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

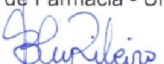
Área de concentração: Farmácia

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 02/07/2018

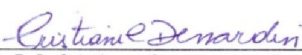
Banca examinadora:



Prof^ª. Dr^ª. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia
Orientadora
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof^ª. Dr^ª. Vanessa Bley Ribeiro
Curso de Farmácia - UNIPAMPA



Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Casagrande Denardin
Curso de Farmácia - UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças, sabedoria e uma fé inabalável para acreditar que chegaria até aqui, sem Ele nada disso seria possível.

A meus pais, pessoas maravilhosas e fundamentais nesta longa caminhada, meus maiores exemplos de vida, os quais jamais me deixaram desistir, me reergueram quando precisei, me apoiaram incondicionalmente e acima de tudo, acreditaram em mim em todos os momentos.

A eles, toda minha gratidão. Amo muito vocês!

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Cheila Stopiglia, por toda dedicação, paciência e apoio oferecidos, pelos ensinamentos que, com certeza, os levarei por toda minha jornada profissional. Tens toda minha admiração e reconhecimento, muito obrigada!

A minha colega de laboratório, mestranda e acima de tudo, amiga Ticiane Pinheiro, pessoa fundamental para realização e conclusão deste trabalho, à qual não hesitou em momento algum me auxiliar nas dificuldades que encontrei e com muita paciência procurou me direcionar sempre da melhor forma. Palavras não são capazes de agradecer tudo que fizeste por mim, minha amiga. Serei eternamente grata, por tudo!

Aos meus amigos e amigas, por todo apoio recebido ao longo deste trabalho, por entenderem minhas ausências constantes e ainda assim, não me abandonarem, por todas as palavras de apoio e motivação nas horas certas, vocês são demais!

Aos amigos distantes em quilômetros e que a pouco entraram em minha vida, mas que se fizeram presentes o tempo todo, saibam que o apoio de vocês foi muito importante para mim, muito obrigada!

Aos colegas de laboratório, por toda ajuda e auxílio recebido quando precisei, vocês foram essenciais e imprescindíveis para realização dos meus experimentos, em especial: Greyce, Roger, Nemeh, Jonathan, Anderson, Fernanda, Ana, Jennifer, Tati e Rici. Muito obrigada por tudo, de coração!

Enfim, mas não menos importante, aos colegas de graduação, por toda ajuda, apoio e suporte oferecidos ao longo de todos esses anos. Não vou citar nomes neste momento, pois não quero esquecer ninguém, mas vocês sabem quem são. Obrigada pelos conteúdos enviados, pelas horas de estudos, sejam eles presenciais ou virtuais e por “segurarem as pontas” quando necessário, especialmente neste semestre. Obrigada à todos! Em especial, agradeço a colega Carolina Morais, pessoa maravilhosa e sempre disposta a me ajudar quando mais precisei, muito, muito obrigada mesmo!

RESUMO

O churrasco gaúcho é instituído por lei o prato típico da região sul do Brasil. A carne bovina é um alimento de alto valor nutritivo sendo muito valorizada para o consumo. Devido às suas características intrínsecas, a carne bovina é um ambiente propício à ação de micro-organismos podendo ser facilmente contaminada, além disso, outros fatores que vão desde o abate até a comercialização podem facilitar sua contaminação. Frente ao exposto, este trabalho teve por objetivo comparar, identificar e avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de carne bovina assada por meio de churrasco gaúcho. Foram realizados três ensaios e para cada ensaio, foram adquiridas três amostras equivalentes a 600g de carne bovina *in natura*, de corte do tipo capa de filé, comercializadas em dois supermercados e um açougue, da cidade de Uruguaiana – RS. As amostras foram armazenadas em embalagens plásticas, conforme fornecidas pelo estabelecimento de compra, e mantidas em refrigeração até o momento de assá-las. As amostras foram analisadas de diferentes formas, sendo: carne fresca, carne mal passada e carne bem passada. O isolamento dos micro-organismos foi realizado em placas de Petri e os isolados obtidos foram submetidos a provas bioquímicas de identificação. Posteriormente, foi realizado o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão em ágar, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Foram isolados um total de trinta e quatro micro-organismos a partir de nove amostras de carne bovina: *Acinetobacter* spp. (n=1), *Citrobacter* spp. (n=9); *Enterobacter* spp. (n=5); *Klebsiella* spp. (n=8); *Listeria* spp. (n=4); *Salmonella* spp. (n=1); *Serratia* spp. (n=1); *Staphylococcus aureus* (n=3); *Staphylococcus* coagulase negativa (n=2). Dentre os principais resultados obtidos, destacamos os isolados de *Staphylococcus aureus* que apresentaram resistência a cefoxitina, configurando resistência aos demais antimicrobianos beta-lactâmicos, a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. que de acordo com a legislação não devem estar presentes em 25g de amostra, foram encontradas, a partir do isolamento em amostras que foram submetidas a diferentes temperaturas, resultando em uma termorresistência desses micro-organismos que, ainda, apresentaram resistência a alguns antimicrobianos testados. Muito embora a ação da temperatura tenha diminuído em quantidade a presença de micro-organismos na carne bovina, ao contrário do que se é esperado, mesmo após totalmente assadas, as amostras ainda apresentaram micro-organismos viáveis. Diante do exposto, a identificação de micro-organismos considerados causadores de infecções alimentares, a resistência antimicrobiana relatada em diferentes micro-organismos e

a presença de micro-organismos termorresistentes é um fator de alerta relacionado à saúde humana.

Palavras-Chave: carne bovina, resistência microbiana, churrasco, contaminação.

ABSTRACT

The gaucho barbecue is instituted by law of a typical dish of the southern region of Brazil. Beef is a food of high nutritional value and is highly valued for consumption. Due to its intrinsic characteristics, beef is an environment conducive to the action of microorganisms and can be easily contaminated, in addition, other factors ranging from slaughter to commercialization can facilitate its contamination. This study aimed to compare, identify and evaluate the antimicrobial susceptibility profile of microorganisms isolated from roasted beef by means of a gaucho barbecue. Three tests were carried out and were purchased three samples equivalent to 600g of fresh beef, fillet type cut, sold in two supermarkets and a butcher's shop in the city of Uruguaiana - RS. The samples were stored in plastic containers, as supplied by the purchasing establishment, and kept in refrigeration until they were baked. The samples were analyzed in different ways, being: fresh meat, undercooked meat and meat well past. Isolation of the microorganisms was performed in Petri dishes and the isolates obtained were submitted to biochemical identification tests. Subsequently, the antimicrobial susceptibility test was performed by agar diffusion method, as described by the *Clinical and Laboratory Standards Institute*. A total of thirty-four microorganisms were isolated from nine beef samples: *Acinetobacter* spp. (n = 1), *Citrobacter* spp. (n = 9), *Enterobacter* spp. (n = 5), *Klebsiella* spp. (n = 8), *Listeria* spp. (n = 4), *Salmonella* spp. (n = 1), *Serratia* spp. (n = 1), *Staphylococcus aureus* (n = 3), *Staphylococcus* coagulase negative (n = 2). Among the main results obtained, we highlight the isolates of *Staphylococcus aureus* that presented resistance to cefoxitin, configuring resistance to the other antimicrobial beta-lactams, the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria* spp. which according to the legislation should not be present in 25g of sample, were found, from the isolation in samples that were submitted to different temperature resulting in a thermoresistance of these microorganisms that still presented resistance to some antimicrobials tested. Although the action of temperature has decreased in quantity the presence of microorganisms in beef, contrary to what is expected, even after fully roasted, the samples still presented viable microorganisms. In view of the above, the identification of microorganisms considered to cause food infections, the antimicrobial resistance reported in different microorganisms and the presence of thermoresistant microorganisms is an alert factor related to human health.

Keywords: beef, microbial resistance, barbecue, contamination.

SUMÁRIO

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	5
<u>2. JUSTIFICATIVA</u>	7
<u>3.OBJETIVOS</u>	8
<u>3.1 Objetivo Geral</u>	8
<u>3.2 Objetivo Específico</u>	8
<u>4. REFERENCIAL TEÓRICO</u>	9
<u>4.1 Caracterização e microbiota da Carne</u>	9
<u>4.2 Cultura da Carne de Churrasco</u>	10
<u>4.3 Micro-organismos contaminantes da carne</u>	11
<u>4.4 Uso de antimicrobianos na agropecuária</u>	12
<u>4.5 Antimicrobianos e mecanismos de resistência</u>	12
<u>5. METODOLOGIA</u>	14
<u>5.1 Coleta e isolamento de micro-organismos</u>	14
<u>5.2 Caracterização de micro-organismos isolados</u>	14
<u>5.2.1 Catalase</u>	17
<u>5.2.2 Oxidase</u>	17
<u>5.2.3 TSI – Triplo Açúcar Ferro</u>	17
<u>5.2.4 LIA – Ágar Lisina Ferro</u>	18
<u>5.2.5 Citrato Simmons</u>	18
<u>5.2.6 SIM- Enxofre Indol Motilidade</u>	18
<u>5.2.7 Urease</u>	19
<u>5.2.8 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos</u>	19
<u>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	20
<u>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	27
<u>8. REFERÊNCIAS</u>	28

1. INTRODUÇÃO

O churrasco gaúcho teve seus primeiros registros em meados do século XVIII, quando a região das Missões sofria uma disputa entre Espanha e Portugal, que ocasionou o declínio dos Sete Povos das Missões, uma sociedade composta por sete aldeamentos indígenas fundados pelos padres jesuítas. Devido a tal disputa, rebanhos de gado foram abandonados em campo aberto, que com o tempo encontraram naquele ambiente, um local para sua proliferação. Os gaúchos caçavam esses animais, em busca de sebo e couro. Porém, a carne bovina não era desejada para comércio, sendo assim, foi utilizada apenas para consumo (ALBRECHT, 2010; MACIEL, 1996).

A Lei nº11. 929 de 23 de junho de 2003, que institui o churrasco como “prato típico” do gaúcho, traz em seu Art.1º, parágrafo único a seguinte definição: “*Para os efeitos desta Lei, entende-se por churrasco à gaúcha a carne temperada com sal grosso, levada a assar ao calor produzido por brasas de madeira carbonizada ou in natura, em espetos ou disposta em grelha, e sob controle manual.*”

A carne bovina é composta principalmente por água e proteínas. É um alimento de alto valor nutricional, além da riqueza em aminoácidos essenciais, ela dispõe também de um alto teor de gordura, vitaminas, glicídios e sais minerais como elementos nutritivos complementares, sendo muito valorizado para consumo (MOURA, 2011).

Devido as suas características intrínsecas, os micro-organismos encontram na carne bovina um ambiente propício para sua multiplicação. Mesmo que os tecidos dos animais sadios sejam considerados estéreis antes do abate, durante o abate, existem diversas condições que favorecem a contaminação da carne bovina, como por exemplo, o processo de evisceração, as mãos do manipulador, a água utilizada na lavagem das carcaças, entre outros (FONTOURA, 2006; HEDRICK *et al.*, 1994).

Dessa forma, a carne bovina pode facilmente ser contaminada e a deterioração dos produtos cárneos pode ser classificada de acordo com a atmosfera que os envolve, sendo a temperatura, um fator de importância que influencia no tipo de deterioração (FELÍCIO, 1993; FRANCO & LANDGRAF, 2008; SALES & PORTO, 2007). Dentre os micro-organismos deteriorantes de produtos cárneos destacam-se os Gram-negativos como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium*, que crescem na superfície do alimento e os Gram-positivos como *Lactobacillus*, que predominam no seu interior. A deterioração pode causar alterações físicas, químicas ou organolépticas, isto é,

alterações na cor, odor, textura, sabor, ou aspecto desses produtos, consequentes da atividade metabólica dos micro-organismos presentes (FONTOURA, 2006; ALCANTARA, 2012).

Na agropecuária, os antimicrobianos são amplamente utilizados como promotores de crescimento animal, sendo muito comum o uso de medicamentos e aditivos incorporados nas rações (ANDREOTTI, 2004). No entanto, algumas substâncias não têm seu uso permitido e outras são proibidas para animais cujos produtos sejam destinados à alimentação, ainda que seja para tratamento clínico, por serem altamente tóxicas (GOMES, 2004). Portanto, a legislação brasileira proíbe “a fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana” (BRASIL, 1998).

Além disso, a presença de resíduos de antimicrobianos em produtos de origem animal tem potencial para causar diferentes reações na saúde humana, dentre elas, a ocorrência de episódios de hipersensibilidade, modificações na microbiota bacteriana natural e resistência (BRITO & PORTUGAL, 2003).

Ainda, a utilização de antimicrobianos na prática veterinária pode ocasionar a presença de resíduos nos produtos de origem animal, os quais podem contribuir para o aparecimento de cepas resistentes que poderão ser transmitidas para o indivíduo que fizer o consumo desses produtos (CDC, 2013; STOLKER & BRINKMAN, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

O churrasco desempenha um papel importante na identidade cultural dos gaúchos, sendo o prato típico da região Sul, mas também, é muito apreciado por diferentes culturas de todo o país e no exterior. O gosto predominante da população em geral pela carne “mal passada” chama atenção para a contaminação da carne, em seus processos de abate, armazenamento, além da sua microbiota inicial.

A utilização de antimicrobianos como suplementação na produção animal e também como tratamento quando necessário, muitas vezes de forma indiscriminada, pode contribuir para a formação de cepas resistentes nestes animais, colocando em risco a saúde dos consumidores.

Deste modo, é demonstrada a importância de isolar, identificar e avaliar o perfil de sensibilidade aos antibióticos dos micro-organismos existentes na carne bovina crua, mal passada e bem passada, para avaliar o efeito da temperatura no processamento desse alimento e na resistência bacteriana.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Comparar, identificar e avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de carne bovina assada por meio de churrasco gaúcho.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar micro-organismos da carne bovina crua e da carne de churrasco;
- Identificar os micro-organismos isolados;
- Avaliar o perfil de sensibilidade aos antibióticos dos micro-organismos isolados;
- Comparar o perfil de sensibilidade dos micro-organismos isolados da carne crua com a carne assada à moda gaúcha, em dois períodos de tempo (bem assada e mal passada).

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Caracterização e microbiota da carne

Em conformidade com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, artigo 17º, compreende-se como carne de açougue as massas musculares maturadas e demais tecidos que as seguem, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária (BRASIL, 1997).

A carne é caracterizada pela natureza das proteínas que a compõem, não somente do ponto de vista quantitativo como qualitativo. Além da riqueza em aminoácidos essenciais, ela dispõe também de um alto teor de umidade, gordura, vitaminas, glicídios e sais minerais como elementos nutritivos complementares (MOURA, 2011). Sua composição contém, em média, 75% de água; 19% de proteínas; 2,5% de gordura; 1,2% de carboidratos; 1,7% de nitrogênio residual e 0,7% de cinzas, podendo variar em função da idade, sexo, raça, manejo e espécie (PRANDL *et al.*, 1994).

A microbiota da carne bovina é composta tanto por bactérias Gram-negativas como por Gram-positivas. Dentre as mais comuns destacam-se os gêneros: *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Clostridium*, *Escherichia* e *Listeria* (FRAIZER, 1993; LEITÃO, 1995).

As características intrínsecas da carne, como composição química, elevada atividade de água e pH aproximadamente neutro, propiciam um ótimo meio para a multiplicação de micro-organismos. Com exceção da superfície externa, trato digestivo, cavidade naso-faríngea e porção final do trato urogenital, os tecidos dos animais sadios podem ser considerados estéreis. No entanto, antes mesmo do processo de abate, os animais já se encontram expostos a condições favoráveis à contaminação, como nas pastagens, nos locais onde ficam confinados e até mesmo durante seu deslocamento até o abatedouro (FONTOURA, 2006).

Além disso, durante o processo de abate, outros fatores podem desencadear a contaminação microbiana na carne, como facas não devidamente esterilizadas que são utilizadas para fazer a sangria do animal, água utilizada para lavagem das carcaças, as mãos dos manipuladores, resultando na introdução de micro-organismos no sistema vascular (HEDRICK *et al.*, 1994).

Dessa maneira além de sua microbiota normal, também pode ser encontrada uma microbiota patogênica, na qual as bactérias que se destacam são: *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, entre outras (FRANCO & LADGRAF, 2008).

4.2 Cultura da carne de churrasco

Aparentemente, o churrasco dos gaúchos, teve seus primeiros registros como tal, em meados do século XVIII, quando a região sofria uma disputa entre Espanha e Portugal, que ocasionou o declínio dos Sete Povos das Missões, uma sociedade composta por sete aldeamentos indígenas fundados pelos padres jesuítas. Devido a tal disputa, rebanhos de gado foram abandonados em campo aberto, que com o tempo encontraram naquele ambiente, um local para sua proliferação. Os gaúchos caçavam esses animais, em busca de sebo e couro. Porém, a carne bovina não era desejada para comércio, sendo assim, foi utilizada apenas para consumo (ALBRECHT, 2010; MACIEL, 1996).

Mais adiante, com a organização das fazendas, os peões alimentavam-se de churrasco de gado preparado em fogo de chão com espetos fincados na terra ao redor do fogo. Apenas no século XX, com a chegada dos imigrantes italianos ao estado, houve uma introdução de temperos e especiarias previamente preparadas no churrasco (PENNA, 2005).

A Lei nº11.929 de 23 de junho de 2003, que institui o churrasco como “prato típico” do gaúcho, traz em seu Art.1º, parágrafo único a seguinte definição: “*Para os efeitos desta Lei, entende-se por churrasco à gaúcha a carne temperada com sal grosso, levada a assar ao calor produzido por brasas de madeira carbonizada ou in natura, em espetos ou disposta em grelha, e sob controle manual.*”

A contaminação por micro-organismos patogênicos na carne é um fator preocupante, principalmente por ser um alimento de alto valor nutritivo e muito consumido mundialmente. Estudos de alimentos que são ingeridos crus ou com pouco cozimento, como carnes de pescados já mostraram contaminações relevantes, como neste estudo de Santos e colaboradores (2012) que analisou 35 amostras de sushis comercializadas em 7 restaurantes de Aracaju-SE, destas, 28 amostras apresentaram

coliformes termotolerantes e 20 foram positivas para *Staphylococcus aureus*, comprovando possíveis riscos potenciais à saúde dos consumidores.

4.3 Micro-organismos contaminantes da carne

Devido a sua caracterização, a carne bovina pode facilmente ser contaminada, principalmente durante a manipulação e o processamento, dependendo dos fatores *ante* e *post mortem* como: alimentação, genética, idade, condições de abate, resfriamento após o abate, maturação, métodos de cocção, entre outros (FELÍCIO, 1993, SALES & PORTO, 2007).

Os tipos mais comuns de deterioração de produtos cárneos podem ser classificados de acordo com a atmosfera que os envolve, sendo a temperatura, um fator de importância que influencia no tipo de deterioração (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Dentre os micro-organismos deteriorantes de produtos cárneos destacam-se os Gram-negativos como *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e *Flavobacterium*, que crescem na superfície do alimento e os Gram-positivos como *Lactobacillus*, que predominam no seu interior. A deterioração pode causar alterações físicas, químicas ou organolépticas, isto é, alterações na cor, odor, textura, sabor, ou aspecto desses produtos, consequentes da atividade metabólica dos micro-organismos presentes (ALCANTARA, 2012).

Entre 2005 e 2010, Lima e colaboradores (2016) analisaram o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de 357 isolados de *Salmonella* spp. provenientes da carne suína pronta para o consumo, através da técnica de disco-difusão, onde 257 (72%) foram resistentes a um ou mais antimicrobianos testados. A maior taxa de resistência foi relacionada com a tetraciclina (44,3%).

Em 2004, Freitas e colaboradores (2004) analisaram o perfil de resistência aos antimicrobianos em carcaças de frango no Recife, onde 22% dos isolados de *Staphylococcus aureus* analisados foram resistentes a cinco dos antimicrobianos testados.

Cepas de *Escherichia coli* isoladas de carnes e dejetos suínos foram submetidas à avaliação de resistência antimicrobiana por Franco e colaboradores (2010), onde todos isolados apresentaram resistência frente aos sete antibióticos testados no estudo, o que limita a terapêutica contra esse micro-organismo (FRANCO, 2010).

4.4 Uso de antimicrobianos na agropecuária

Os antibióticos são amplamente utilizados como promotores de crescimento nos sistemas de produções atuais. Desta forma, é comum o uso de medicamentos e aditivos incorporados nas rações dos animais para promover seu rápido desenvolvimento e ganho de peso (ANDREOTTI, 2004).

Algumas substâncias não têm seu uso permitido para melhora no crescimento, e outras são proibidas para animais produtores de alimentos, ainda que seja para tratamento clínico, por serem altamente tóxicas (GOMES, 2004). Sendo assim, a legislação brasileira proíbe “a fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana” (BRASIL, 1998).

A presença de resíduos de antibacterianos em produtos de origem animal tem potencial para causar diferentes reações na saúde humana, dentre elas a ocorrência de episódios de hipersensibilidade, resistência e modificações na microbiota bacteriana normal (BRITO & PORTUGAL, 2003). A utilização de antimicrobianos inadequados na prática veterinária pode ocasionar a presença de resíduos nos produtos de origem animal, os quais podem levar a ocorrência de cepas resistentes e a bactéria poderá ser transmitida para o indivíduo que consumí-la (CDC, 2013; STOLKER & BRINKMAN, 2005).

4.5 Antimicrobianos e mecanismos de resistência

Em 1940, as penicilinas, marcaram o início do uso clínico dos antimicrobianos, produzidas em grande escala e amplamente utilizadas nos ferimentos dos soldados durante a Segunda Guerra Mundial, quando foi levantada a hipótese de que as infecções seriam um problema passado. Porém, devido ao seu uso indevido, em 1946 foram isoladas as primeiras bactérias resistentes às penicilinas, iniciando assim, o grande desafio contra a resistência bacteriana (FERNANDES, 2000; ROSSI& ANDREAZZI, 2005).

A resistência aos antimicrobianos é um dos temas de maior relevância estudado pela medicina moderna, que enfrenta o desafio de reduzir a resistência sem descontinuar o uso de todos os antimicrobianos. Outra questão importante é como e quando utilizar

os antimicrobianos lançados no mercado que ainda agem contra micro-organismos multiresistentes (BUMANN, 2008).

Nas últimas décadas, diversas espécies bacterianas têm demonstrado resistência a um número cada vez maior de antimicrobianos e, conseqüentemente, alguns desses princípios ativos tornam-se não efetivos no tratamento de infecções. O uso inadequado e indiscriminado dos antimicrobianos certamente colaborou para o desencadeamento dos mecanismos de resistência das bactérias (FERNANDES, 2000; PIDDOCK, 2006; ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Os micro-organismos utilizam diferentes mecanismos de resistência para se defenderem da ação dos antimicrobianos, como por exemplo, a inativação enzimática, que degrada os anéis β -lactâmicos das penicilinas e cefalosporinas, através da ação da enzima β -lactamase (GOERING, 2014). A bomba de efluxo é outro mecanismo já descrito, onde o micro-organismo é capaz de realizar um efluxo ativo, fazendo com que os antimicrobianos sejam eliminados da célula microbiana (TORTORA *et al.*, 2016).

Outro mecanismo descrito compreende as alterações no alvo dos ribossomos, que é decorrente de alterações no sítio de ligação ribossomal, constituindo resistência a determinados antimicrobianos (AGUIAR, 2008). Além disso, a alteração na permeabilidade da membrana externa bacteriana pode tornar o antimicrobiano incapaz de penetrar e destruir a célula microbiana (TORTORA *et al.*, 2016).

5. METODOLOGIA

5.1 Coleta e isolamento de micro-organismos

Foram realizados três ensaios e para cada ensaio, foram adquiridas três amostras equivalentes a 600g de carne bovina *in natura*, de corte do tipo capa de filé, comercializadas em dois supermercados e um açougue, da cidade de Uruguaiana – RS. As amostras foram armazenadas em embalagens plásticas, conforme fornecidas pelo estabelecimento de compra, e mantidas em refrigeração até o momento de assá-las.

A amostra de carne foi dividida assepticamente com o auxílio de um bisturi em três partes que foram analisadas de diferentes formas, sendo: carne fresca, carne mal passada e carne bem passada. As amostras de carne mal passada e bem passada foram assadas em brasa sob uma grelha, como tradicionalmente é feito nos churrascos gaúchos.

Após preparo das amostras, foram pesados assepticamente $25\text{g} \pm 0,2\text{g}$ de carne, retiradas com o auxílio de um bisturi da parte interna de cada amostra que foram adicionadas em 225 mL de solução salina peptonada 0,1%. As amostras foram homogeneizadas em uma câmara incubadora com agitação orbital por 18 horas a 15°C . Após este período, foram realizadas diluições na faixa de 10^{-1} a 10^{-5} em água peptonada (BRASIL, 2003).

Com as amostras diluídas, uma alíquota de $25\mu\text{L}$ de cada diluição foi adicionada sob a superfície de placas de Petri contendo os meios de cultura ágar sangue de carneiro e MacConkey e, em seguida, espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, até sua completa absorção. Após a inoculação, as placas foram incubadas e invertidas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

5.2 Caracterização dos micro-organismos isolados

Após o período de incubação dos micro-organismos, foram realizadas as análises morfológicas das placas que apresentaram contagem adequada de micro-organismos (25 a 250 UFC/placa) e as colônias isoladas foram classificadas inicialmente através da técnica de coloração de Gram. Os micro-organismos foram identificados por provas específicas e testes bioquímicos já descritos na literatura para grupos de cocos Gram-positivos, cocos Gram-negativos, bacilos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos, conforme fluxogramas abaixo (Figuras 1, 2, 3 e 4).

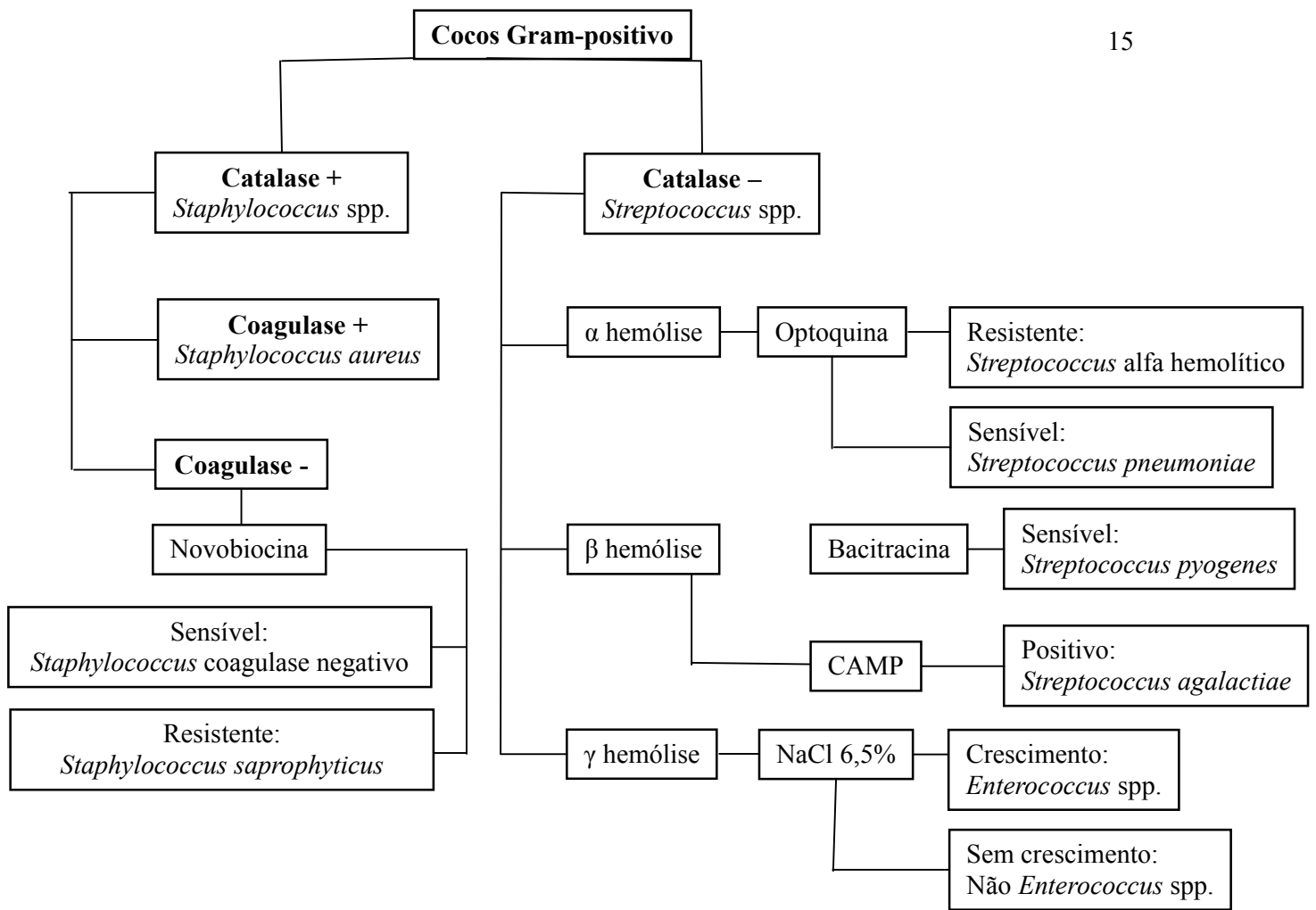


Figura 1: Fluxograma de provas de identificação para Cocos Gram-positivos.

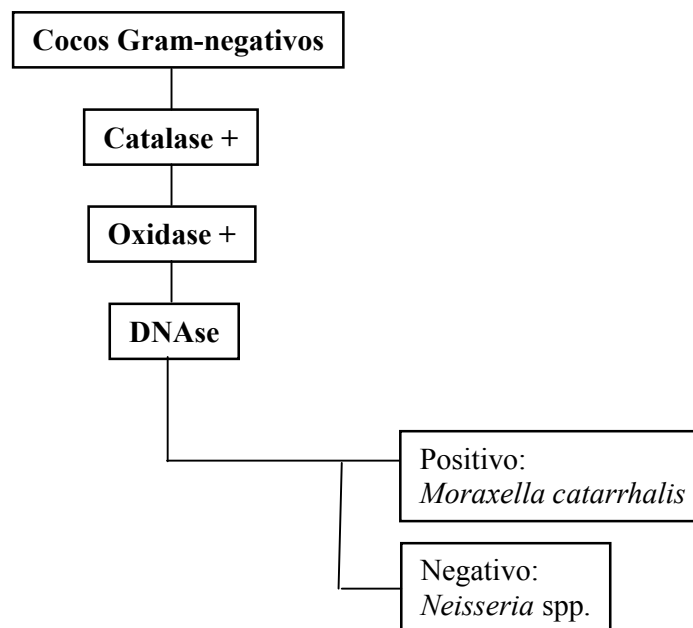


Figura 2: Fluxograma de provas de identificação para Cocos Gram-negativos.

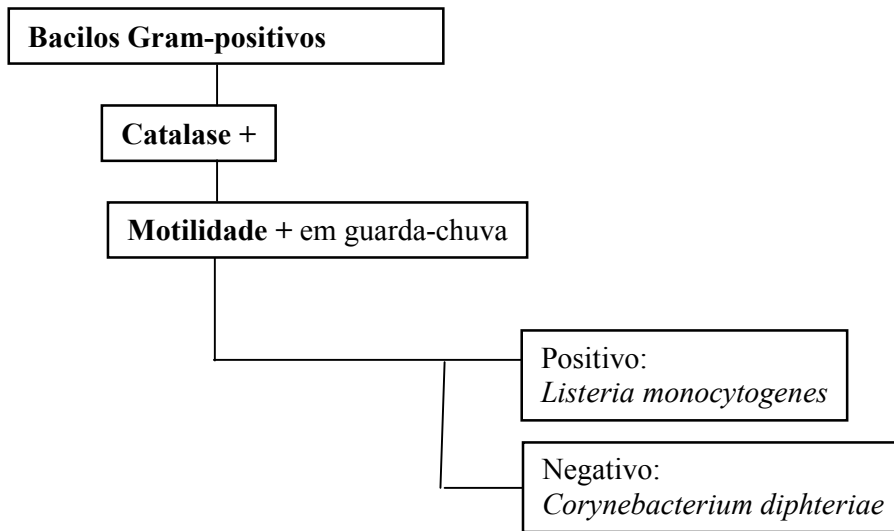


Figura 3: Fluxograma de provas de identificação para Bacilos Gram-positivos.

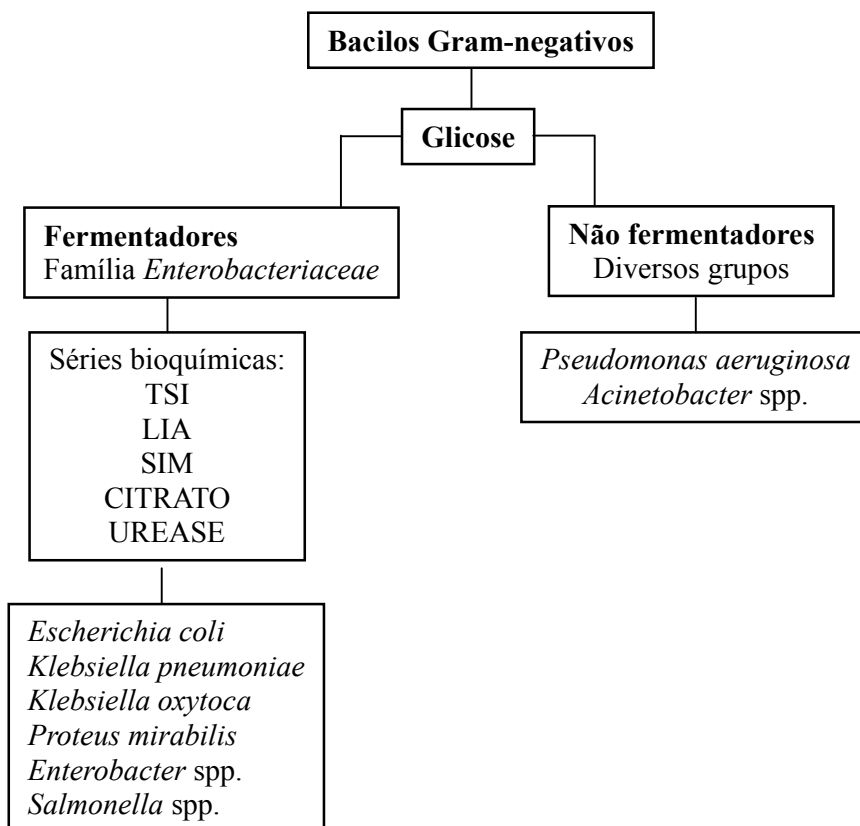


Figura 4: Fluxograma de provas de identificação para Bacilos Gram-negativos.

Fonte: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf

5.2.1 Catalase

Utilizando uma lâmina, foi colocada uma gota de peróxido de hidrogênio 3% e com uma alça bacteriológica foi retirada uma colônia da placa de Petri, sendo aderida na gota de peróxido de hidrogênio. O resultado positivo é evidenciado pela presença imediata de bolhas ou efervescência (BARTH *et al.*, 2010).

5.2.2 Oxidase

Com o auxílio de um palito de madeira ou plástico foi espalhada uma colônia sobre uma fita de oxidase. Resultado positivo: formação de coloração roxa na fita, resultado negativo: sem mudanças de coloração na fita (OPLUSTIL *et al.*, 2010).

5.2.3 TSI – Triplo Açúcar Ferro

Em tubos contendo o meio ágar TSI, foi realizada a inoculação dos micro-organismos por meio de uma picada na base e estriamento no ápice do ágar, com o auxílio de uma agulha bacteriológica.

Os tubos foram incubados por 24h à 35°C e serão observados os resultados, sendo: ápice/base - púrpura/amarelo = fermentação apenas da glicose (lactose e sacarose negativa) amarelo/amarelo = fermentação da glicose + lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares). Avaliação da presença de gás (CO₂) = bolhas ou meio fragmentado. Avaliação de H₂S positivo = presença de precipitado negro (BARTH *et al.*, 2010).

5.2.4 LIA – Ágar Lisina Ferro

Em tubos contendo o meio ágar LIA foi realizada a inoculação dos microorganismos por meio de uma picada na base e estriamento no ápice do ágar, com o auxílio de uma agulha bacteriológica. Os tubos foram incubados por 24h à 35°C e serão observados os resultados, sendo: Descarboxilação de Lisina - positivo: fundo roxo (alcalino), ápice roxo; negativo: fundo amarelo (ácido), ápice roxo. Desaminação da Lisina - positivo: ápice vermelho, negativo: ápice roxo (BARTH *et al.*, 2010).

5.2.5 Citrato de Simmons

Em tubos contendo o meio ágar Citrato foi realizada a inoculação dos microorganismos por meio de estriamento do ápice sem atingir a base do meio, com o auxílio de uma agulha bacteriológica. Os tubos foram incubados por 24h à 35°C e foram observados os resultados, sendo: positivo - cor azul ou crescimento no local do inóculo; negativo - não há crescimento e a cor permanece inalterada (BARTH *et al.*, 2010).

5.2.6 SIM – Enxofre Indol Motilidade

Em tubo contendo o meio ágar SIM deverá ser realizada a inoculação do microorganismo por meio de uma picada na base do ágar, sem atingir o fundo do tubo, com o auxílio de uma agulha bacteriológica. O tubo será incubado por 24h à 35°C e primeiramente será observado o resultado de motilidade. Motilidade positiva: bactérias apresentam crescimento acentuado ao longo da linha do inóculo na parte central do tubo. Será observada a presença de H₂S. H₂S positivo: presença da cor negra ao longo do inóculo. Após foram adicionadas cinco gotas do reagente de Kovacs pela parede do tubo e foi observado o indol. Resultado positivo: presença de um anel vermelho (OPLUSTIL *et al.*, 2010).

5.2.7 Urease

Em tubo contendo o meio ágar Uréia, foi realizada a inoculação dos micro-organismos por meio de estriamento do ápice sem perfurar a base do ágar, com o auxílio de uma agulha bacteriológica. O tubo foi incubado por 24h à 35°C e foram observados os resultados. Resultado positivo: alteração de coloração no meio de amarelo para rosa. Resultado negativo: sem alteração de coloração no meio (OPLUSTIL *et al.*, 2010).

5.2.8 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

Os micro-organismos após identificados, foram submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pela técnica de disco difusão em ágar, conforme descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Para a realização da técnica, foram utilizados discos comerciais de papel filtro já impregnados com concentrações conhecidas dos antimicrobianos preconizados para cada espécie bacteriana, segundo CLSI. Após a incubação, foram medidos os halos de inibição com auxílio de paquímetro e a partir dos valores obtidos, os micro-organismos foram classificados como sensível, intermediário ou resistente para cada antibiótico avaliado (CLSI, 2015).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados e identificados um total de trinta e quatro micro-organismos a partir de três experimentos realizados, conforme Tabela 1 e zoneamento dos isolados, descrito na Tabela 2.

Tabela 1: Demonstrativo dos experimentos realizados e micro-organismos isolados por amostra.

Experimento	Amostra – Carne bovina	Micro-organismos isolados
01	Crua (C)	<i>Enterobacter</i> spp. (n=1) <i>Klebsiella</i> spp. (n=1) <i>Serratia</i> spp. (n=1) <i>Listeria</i> spp. (n=1)
01	Mal passada (MP)	<i>Enterobacter</i> spp. (n=3) <i>Klebsiella</i> spp. (n=3) <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (n=1)
01	Assada (A)	<i>Listeria</i> spp. (n=1)
02	Crua (C)	<i>Citrobacter</i> spp. (n=1) <i>Enterobacter</i> spp. (n=1) <i>Klebsiella</i> spp. (n=2) <i>Listeria</i> spp. (n=1)
02	Mal passada (MP)	<i>Citrobacter</i> spp. (n=1) <i>Klebsiella</i> spp. (n=1) <i>Salmonella</i> spp. (n=1)
02	Assada (A)	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=1) <i>Citrobacter</i> spp. (n=1) <i>Listeria</i> spp. (n=1)
03	Crua (C)	<i>Acinetobacter</i> spp (n=1). <i>Citrobacter</i> spp. (n=5)
03	Mal passada (MP)	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (n=1) <i>Staphylococcus aureus</i> (n=1)
03	Assada (A)	<i>Citrobacter</i> spp. (n=1) <i>Klebsiella</i> spp. (n=1) <i>Staphylococcus aureus</i> (n=1)

Tabela 2: Zoneamento dos micro-organismos isolados.

Micro-organismo	Nº	Micro-organismos
Carne crua	16	<i>Acinetobacter</i> spp. (n=1) <i>Citrobacter</i> spp. (n=6) <i>Enterobacter</i> spp. (n=2) <i>Klebsiella</i> spp. (n=3) <i>Listeria</i> spp. (n=2) <i>Serratia</i> spp. (n=1) <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (n=1)
Carne mal passada	12	<i>Citrobacter</i> spp. (n=1) <i>Enterobacter</i> spp. (n=3) <i>Klebsiella</i> spp. (n=4) <i>Salmonella</i> spp. (n=1) <i>Staphylococcus aureus</i> (n=2) <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (n=1)
Carne assada	06	<i>Citrobacter</i> spp. (n=2) <i>Klebsiella</i> spp. (n=1) <i>Listeria</i> spp. (n=2) <i>Staphylococcus aureus</i> (n=1)

As tabelas 3 a 6 referem-se ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos testados frente a cada grupo de micro-organismos isolados.

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de enterobactérias.

Isolados	TOB	AMP	CFZ	ERT	AMC
<i>Citrobacter</i> spp. (C2)	S	R	R	S	R
<i>Citrobacter</i> spp. (MP2)	S	R	R	S	S
<i>Citrobacter</i> spp. (A2)	S	S	R	S	S
<i>Citrobacter</i> spp. (C3)	S	S	R	S	S
<i>Citrobacter</i> spp. (C3)	S	S	S	S	S
<i>Citrobacter</i> spp. (C3)	S	S	R	S	I
<i>Citrobacter</i> spp. (C3)	S	R	R	S	S
<i>Citrobacter</i> spp. (C3)	S	I	R	I	S
<i>Citrobacter</i> spp. (A3)	S	I	R	S	S
<i>Klebsiella</i> spp. (C1)	S	S	R	S	S
<i>Klebsiella</i> spp. (MP1)	S	S	S	S	S

<i>Klebsiella</i> spp. (MP1)	S	I	R	I	S
<i>Klebsiella</i> spp. (MP1)	S	R	R	S	S
<i>Klebsiella</i> spp. (C2)	S	R	R	I	S
<i>Klebsiella</i> spp. (C2)	S	R	R	R	S
<i>Klebsiella</i> spp. (MP2)	S	S	R	S	S
<i>Klebsiella</i> spp. (A3)	S	I	R	I	R
<i>Enterobacter</i> spp. (C1)	S	S	S	S	S
<i>Enterobacter</i> spp. (MP1)	S	S	R	S	S
<i>Enterobacter</i> spp. (MP1)	S	I	R	S	S
<i>Enterobacter</i> spp. (MP1)	S	S	R	S	S
<i>Enterobacter</i> spp. (C2)	S	S	R	S	S
<i>Salmonella</i> spp. (MP2)	S	R	R	I	I
<i>Serratia</i> spp. (C1)	S	R	R	S	R

C= carne crua; MP= mal passada; A= assada; os números 1, 2 e 3 = referem-se aos experimentos; TOB = tobramicina; AMP = ampicilina; CFZ = cefazolina; ERT = ertapenem; AMC = amoxicilina+clavulanato; S= sensível; R= resistente; I = intermediário.

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cocos gram-positivos.

Isolados	AZI	CLI	PEN	CFO
<i>Staphylococcus aureus</i> (MP2)	S	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i> (MP3)	S	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i> (A3)	S	R	R	R
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (MP1)	S	R	R	R
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (C3)	S	R	R	R

C= carne crua; MP= mal passada; A= assada; os números 1, 2 e 3 = referem-se aos experimentos; AZI = azitromicina; CLI = clindamicina; PEN = penicilina; CFO = ceftioxina; S= sensível; R= resistente.

Tabela 5. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de bacilos gram-positivos.

Isolados	ERI	CLI	PEN
<i>Listeria</i> spp. (C1)	S	S	R
<i>Listeria</i> spp. (A1)	S	S	R
<i>Listeria</i> spp. (C2)	S	S	R
<i>Listeria</i> spp. (A2)	S	S	R

C= carne crua; A= assada; os números 1 e 2 = referem-se aos experimentos; ERI = eritromicina; CLI = clindamicina; PEN = penicilina; S= sensível; R= resistente.

Tabela 6. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cocos gram-negativos.

Isolado	TOB	LEV	APS	MPM	AMI
<i>Acinetobacter</i> spp. (C3)	S	S	S	S	S

C= carne crua; o número 3 refere-se ao experimento; TOB= tobramicina; LEV = levofloxacino; APS = ampicilina+sulbactam; MPM = meropenem; AMI = amicacina; S= sensível.

A resolução da ANVISA, RDC nº12 de janeiro de 2001, que aprova o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, estabelece a ausência dos micro-organismos *Salmonella* spp. em 25g de carne crua e produtos cárneos prontos para o consumo (ANVISA, 2001). Em nosso estudo foi identificado um isolado de *Salmonella* spp. em uma amostra de 25g de carne mal passada (Tabela 1). A *Salmonella* é uma enterobactéria que está descrita na maioria dos estudos de surtos alimentares, como causadora da salmonelose, uma infecção associada à ingestão de alimentos ou água contaminados. No nosso estudo, foi identificado um isolado deste micro-organismo, em uma amostra de carne mal passada, já em um estudo realizado por Silva e colaboradores em 2010, onde foram analisados 11 pontos de venda ambulante de carne bovina assada em Goiás, nenhuma amostra apresentou a presença de *Salmonella* spp. Em 2004, Silva realizou uma comparação dos efeitos do cozimento de água e vapor em cortes de carnes, onde não foi descrito nenhum isolado de *Salmonella* spp. em nenhuma das três amostras cruas e das três amostras cozidas das carnes analisadas.

Dos cinco antibióticos testados em nosso estudo: tobramicina, ampicilina, cefazolina, ertapenem e amoxicilina+clavulanato, o isolado apresentou sensibilidade apenas para tobramicina, apresentando resistência intermediária para os antimicrobianos ertapenem e amoxicilina+clavulanato e resistência à ampicilina e cefazolina (Tabela 3). Essa resistência pode ser comparada ao estudo de Alcântara e colaboradores (2012) que encontrou em 100% dos seus isolados de *Salmonella* spp., resistência à ampicilina.

A *Listeria* spp. é uma bactéria com ampla distribuição na natureza e algumas espécies do gênero são comumente encontradas nas fezes de animais, tornando a presença desse micro-organismo frequente em carnes cruas, inclusive por apresentar

característica psicrotrófica, que lhe confere a capacidade de se desenvolver a 7°C ou menos, sendo um gênero bastante expressivo em produtos que são armazenados sob refrigeração. Além disso, esses micro-organismos tem a capacidade de produzir enzimas proteolíticas ou lipolíticas termorresistentes, mantendo sua viabilidade por maior período de tempo no alimento, mesmo após ação da temperatura. A espécie *Listeria monocytogenes* é um patógeno com importante destaque, sendo descrito cada vez mais em surtos de listeriose, infecção causada por esse micro-organismo, associada ao consumo de produtos de origem animal, entre eles, leite, queijos, carnes e pescados (RODRIGUES *et al.*, 2016; PIETA, 2010).

A RDC nº 12 de 2001, da mesma forma que exige a ausência de *Salmonella* spp. em 25g de carne crua e carnes prontas para o consumo, também estabelece como exigência, a ausência de *Listeria* spp. (ANVISA, 2001), que foi encontrada em quatro amostras do nosso estudo, sendo que dois isolados são oriundos de carne crua e os outros dois isolados provêm de carne assada, obtidas dos experimentos 1 e 2, conforme descrito na Tabela 5. Nosso resultado se mostra preocupante e um número muito superior ao do estudo de Lambertz, em 2010, na Suécia, após crescentes casos de listerioses, que analisou a prevalência e os níveis de *Listeria monocytogenes* em três categorias de alimentos, entre elas, alimentos cárneos prontos para o consumo, e encontrou esse micro-organismo em apenas seis das 507 amostras de carnes analisadas. Palma e colaboradores (2017), analisaram um total de 125 cortes cárneos bovinos no Distrito Federal, Brasil, onde foram detectadas e caracterizadas molecularmente onze cepas de *Listeria monocytogenes*. Outro estudo realizado em Nitérois, Rio de Janeiro, analisou 30 amostras de carne moída das quais duas foram positivas para *Listeria monocytogenes* (MANTILLA *et al.*, 2007). Nossos dados são numericamente superiores aos relatados e, o que preocupa ainda mais, é o fato dos micro-organismos serem resistentes a altas temperaturas e, por isso, foram encontrados também, na carne assada.

Com relação ao perfil de sensibilidade apresentado pelos quatro isolados de *Listeria* spp., todos apresentaram resistência à penicilina e sensibilidade aos demais antimicrobianos testados, e essa resistência à penicilina foi semelhantemente relatada no estudo feito por Palma e colaboradores (2017), onde as 11 cepas de *Listeria monocytogenes* que foram identificadas e caracterizadas molecularmente a partir de amostras de cortes bovinos, apresentaram resistência a penicilina.

Os gêneros mais frequentes identificados em nossos resultados foram *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., que corroboram com estudo de

Sousa e colaboradores (2007), que realizou a identificação de bactérias em amostras de carne de caranguejo *in natura* e dentre as diferentes espécies identificadas, os gêneros *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella oxycota*, *Citrobacter amalonaticus* e *Citrobacter* spp. foram isolados da carne de caranguejo *in natura*.

No presente estudo, três isolados de *Klebsiella* demonstraram-se sensíveis a ampicilina, o que corrobora com o estudo de Alcântara e colaboradores (2012), que avaliou o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de cortes de carne bovina, e constatou que todos isolados de *Klebsiella* foram sensíveis à ampicilina.

Dos isolados de *S. aureus* identificados em nosso estudo, cabe ressaltar, que dois destes isolados são oriundos de carne mal passada e um da carne assada. O gênero *Staphylococcus* é bastante descrito como contaminante em carnes cruas, como no trabalho realizado com 15 carcaças de frango, sendo 10 resfriadas e submetidas a um abate tecnológico com Inspeção Federal e cinco *in natura* submetidas a um abate artesanal sem Inspeção Federal adquiridas em estabelecimentos comerciais na cidade de Recife, que isolou oito *Staphylococcus* spp. e sete *Staphylococcus aureus* (Freitas *et al.*, 2004). O Estudo de Almeida *et al.* (2010) verificou que 60% e 40% das amostras de acém moído e bifes de coxão mole, respectivamente, continham elevado teor de *Staphylococcus aureus*. Já em 2015 uma avaliação da contaminação por *S. aureus* em espetinhos de carne e frango comercializados em Pernambuco, realizada por Dias e colaboradores, nove das dez amostras analisadas apresentaram-se contaminadas com *S. aureus*, resultado que corrobora com nossos achados, comprovando a permanência desse micro-organismo no alimento, mesmo após ser submetido à ação da temperatura, sinalizando um alerta de modo que *S. aureus* está descrito juntamente com outros micro-organismos como principais causadores de doenças de origem alimentar.

Os três isolados de *S. aureus* encontrados em nosso estudo, mostraram-se resistentes à clindamicina, penicilina e cefoxitina, apresentando suscetibilidade apenas para azitromicina. Importante ressaltar que em 2005 o CLSI incluiu o ponto de corte de cefoxitina para isolados de *S. aureus* com finalidade de detectar resistência a oxacilina, reportando nossos resultados como resistente também a outros beta-lactâmicos, dentre eles, a penicilina como demonstrado na Tabela 4, restringindo a possibilidade de tratamento em casos de infecções por esse micro-organismo.

No nosso estudo foi identificado um isolado do gênero *Acinetobacter* em uma amostra de carne crua. *Acinetobacter* é uma bactéria Gram-negativa, estritamente não

fermentadora, amplamente encontrada no solo, na água, nos vegetais, porém esse gênero é comumente descrito como agente causador de infecções nosocomiais em pacientes de unidades de terapia intensiva. Desse modo, estudos de prevalência e resistência desses micro-organismos em alimentos são pouco investigados (MARTINS, 2013). Em 2017, Cavalheira foi pioneiro de um estudo que avaliou a prevalência e diversidade de *Acinetobacter* spp. em alfaces e diferentes frutas em Portugal, onde 54 dos 181 isolados desse gênero foram resistentes a diferentes antimicrobianos. O isolado encontrado em nosso estudo, foi sensível à todos os antibióticos testados, expressando um resultado positivo para este achado. Pode-se dizer ainda que possivelmente essa contaminação tenha se dado de manuseio e higiene incorretos, tanto no abatedouro quanto no açougue.

De acordo com a Tabela 2, onde foi estabelecido o zoneamento dos micro-organismos isolados, pode-se perceber que a carne crua foi o tipo de amostra que mais se isolaram micro-organismos. Com a ação da temperatura, os micro-organismos que são termorresistentes permaneceram viáveis nas amostras, e ao contrário do que era esperado, na carne assada ainda permaneceram-se viáveis alguns desses micro-organismos, mostrando então, a grande resistência desses micro-organismos patogênicos mesmo com o aumento da temperatura.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação por micro-organismos patogênicos na carne bovina, tem se tornado cada vez mais um fator agravante, visto que o churrasco não é mais um prato típico apenas do gaúcho, mas sim, muito bem aceito por todo país e no exterior. De acordo com os resultados obtidos através deste trabalho, pode-se concluir que a identificação de micro-organismos considerados causadores de infecções alimentares, a resistência antimicrobiana relatada em diferentes micro-organismos e a presença de micro-organismos termorresistentes é um fator de alerta relacionado à saúde humana. Com isso, é importante ressaltar que o uso racional de antimicrobianos em animais e humanos, pode contribuir para minimizar esses fatores de contaminação.

8. REFERÊNCIAS

AGUIAR, E. **Introdução à microbiologia clínica e ao tratamento de doenças infecciosas**. 1. ed. S. Paulo: Casa do Novo Autor, 2008. v. 150. 128p

ALBRECHT, C.F. **Além da carne assada sobre brasas: os elementos da experiência de consumo do churrasco**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Administração, Programa de PósGraduação em Administração, 2010.

ALCANTARA, Marcela de; MORAIS, Isabela C. L. de; MATOS, Cyllene de; SOUZA, Ornelas da C. C. de. **Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos**. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.6, n.1) p. 1 – 18 jan – jun (2012).

ALCANTARA, Michele A.; GATTO, Igor R. H.; KOZUSNY-ANDREANI, Dora I. Ocorrência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de cortes de carne bovina. **Veterinária em Foco**. Canoas v.10 n.1 p.80-92, jul./dez. 2012.

ALMEIDA, A.C.; SOUZA, R.M.; PINHO, L.; SOBRINHO, E.M.; SILVA, B.C.M. Determinação de perigos microbiológicos em carnes bovinas resfriadas provenientes de abates clandestinos e comércio ilegal. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 4, n. 4, p. 278-285, 2010.

ANDREOTTI, Renato; NICODEMO, Maria Luiza Franceschi. **Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência**. Embrapa Gado de Corte, 2004.

BARTH, A. L. ; Peixoto ; PIETA, V. P. ; MARTINS, A. F. . **Bacteriologia Clínica - Manual de Aulas Práticas**. 1. ed. Porto Alegre: Editora Sulina, 2010. v. 1. 101 p

BUMANN, D. **Has nature already identified all useful antibacterial targets?** Current opinion on Microbiology, v. 11, p. 387-392, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos de alimentos. DOU, Brasília, 2001. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>>>. Acesso em: 20 de junho de 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto n.30.691. 29 de mar. 1952, alterado pelos Decretos n.1255. 25 jun. 1962, n.1236. 02 set. 1994, n.1812. 08 fev. 1996, n.2244. 04 jun. 1997. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília: Ministério da Agricultura, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial [da] União, Brasília, 1997. 241p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 448, de 10 de setembro de 1998 – **Proíbe a fabricação, importação, comercialização e o emprego**

de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares, contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona em animais cujo produto seja destinado ao consumo humano. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº62, de 26 agosto de 2003: **Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água.** Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-sda-62-de-26-08-2003,665.html>>. Acesso em 10 de abril de 2018.

BRITO, J.R.F; PORTUGAL, J.A.B; **Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos e antibióticos.** EmbrapaGado de Leite, EPAMIG, Juiz de Fora, 2003.

CARVALHEIRA, Ana; SILVA, Joana; TEIXEIRA, Paula. Lettuceandfruits as a sourceofmultidrugresistantAcinetobacter spp. **Foodmicrobiology**, v. 64, p. 119-125, 2017.

CDC. **Centers Disease Control and Prevention.** Antibiotic Resistance Threats in the United States.; US., 2013.

CLSI. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Discodifusão: Norma Aprovada – Oitava Edição,** 2015. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf> Acesso em: 06 de abril de 2018.

DIAS, Maria Bárbara Nanes; JÚNIOR, Agenor Tavares Jácome; FERREIRA, Adilma Leite. Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus*, Coliformes e *Salmonella* sp. em espetinhos comercializados por ambulantes no centro de Caruaru-PE. 2016.

EVANGELISTA-BARRETO, Norma Suely *et al.* Veiculação de enterobactérias resistentes aos antimicrobianos em frutos do mar. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 10, n. 2, p. 01-15, 2017.

FELÍCIO, P. E. de. 1993. **Fatores ante e post mortem que influenciam na qualidade da carne vermelha.** Anais dos Simpósios da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Rio de Janeiro-RJ, p.43-52.

FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde.** 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 953 p, v.1.

FONTOURA, C. L. **Estudo microbiológico em carcaças bovinas e influência da refrigeração sobre a microbiota contaminante.** Jaboticabal, 2006.

FRAIZER, W. C.; WESTHOFF, D. C.; **Microbiologia de los alimentos.** 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008. 93-98 p.

FRANCO, Robson Maia *et al.* **Resistência antimicrobiana de Escherichia coli isoladas de carne e dejetos suínos**. Acta VeterinariaBrasilica, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.

FREITAS, M.F.L. Freitas, MOTA, R.A., LEÃO, A.E.D., FIGUEIREDO, M.L. Figueiredo. **Sensibilidade antimicrobiana de cepas de Staphylococcus spp. isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife**. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.56, n.3, p.405-407, 2004.

GOERING, Richard V. **Microbiologia Médica de Mims** / Richard V. Goering ; [tradução Alcir Costa Fernandes]. - [5. ed.] - Rio de Janeiro : Elsevier, 2014. 538 p. : il. ; 27 cm.

GOMES, Danielle de Moraes. **Resíduos de antibióticos promotores de crescimento em produtos de origem animal**. 2004. 78 f. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos)-Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

HEDRICK, H. B.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; JUDGE, M. D.; MERKEL; R. A. **Principles of meat science**. 3th ed. Iowa: Kendall/Hunt PublishingCompany, 1994. cap. 8, p.173-174.

LAMBERTZ, S. Thisted *et al.* Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 24-31, 2012.

LEITÃO, M. F. F. **Controle do desenvolvimento microbiano no processamento industrial da carne e produtos**. B. ITAL, Campinas, v. 21, p. 89-108, 1995.

LIMA, A. L.; RODRIGUES, D.P.; ARAÚJO, M.S.; REIS, E.M.F.; FESTIVO, M.L.; RODRIGUES, E.C.P.; LÁZARO, N.S. Sorovares e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em *Salmonella* spp. isoladas de produtos de origem suína. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.1, p.39-47, 2016.

MACIEL, Maria Eunice. **Churrasco à Gaúcha**. **Horizontes Antropológicos**, v. 2, n. 4, p. 34-48, jan./jun. 1996.

Mantilla S.P.S., Franco R.M., Oliveira L.A.T., Santos E.B. & Gouvêa R. 2007. Ocorrência de *Listeria* spp. em amostras de carne bovina moída comercializadas no município de Niterói, RJ, **Brasil. Ciênc. Agrotec.**, Lavras, 31(4):1225-1230.

MARTINS, Andreza F.; BARTH, Afonso L.– *Acinetobacter* multirresistente – um desafio para a saúde pública. **Scientia Medica**; volume 23, número 1, p. 56-62. Porto Alegre, 2013.

MOURA, EdinaidySuianny Rocha de. **Sanitary aspects of municipal slaughterhouses in the state of Rio Grande do Norte**. 2011. 63 f. Dissertação (Mestrado em Sanidade e Produção Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

OPLUSTIL C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI N. R.; SINTO S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3ª ed., São Paulo: SARVIER, 2010.

PALMA, Joana M. et al. Caracterização molecular de *Listeriamonocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 10, p. 957-964, 2017.

PENNA, Ricardo. **Alquimia do Churrasco: para os amantes da carne**. Belo Horizonte: Editora Leitura, 2005.

PIDDOCK, L. J. V. **Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance**. Nature Publishing Group, v. 4 p. 629-636, 2006.

PIETA, Luiza. Investigação da presença de *Listeria* spp. e *Listeriamonocytogenes* em equipamentos e utensílios de indústrias de laticínios. 2010.

PRANDL, O. et al. **Tecnologia e Higiene de la carne**. Zaragoza: Acribia, 1994.

RODRIGUES, Carla Susana; SÁ, Cláudia Valéria Gonçalves Cordeiro de; MELO, Cristiano Barros de. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Ciência Rural*, v. 47, n. 2, 2017.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistencia bacteriana. Interpretando o antibiograma**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.118.

SALES, R.O. & PORTO, E. Disseminação Bacteriana. **Principais Patógenos e Higienização no Abate de Frangos: Uma Revisão**. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*. v.1, n. 1, p. 14 – 36, 2007.

SANTOS, A. A.; SIMÕES, G. T. N.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, N. S. S.; LIMA, R. T. C.; TUNON, G. I. L. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**. Vol. 8 num. 3, 2012.

SILVA, Luís Antônio Dantas; LIRA, Caroline Bailona; DE SOUZA, Keili Maria Cardoso. Comércio ambulante: qualidade microbiológica de carne assada e conhecimento sobre as boas práticas de manipulação. **Revista de Patologia Tropical**, v. 43, n. 3, p. 255-264, 2014.

SILVA, M. L. Efeito de dois métodos de cocção—água e vapor—nos parâmetros de qualidade do músculo Semitendinosus. Piracicaba, 2004. 114 p. 2004. **Tese de Doutorado**. Dissertação—(Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo—USP.

SILVESTRE, M.K.; ABRANTES, M.R.; PAIVA, W.S.; SOUZA, Ê.S.; SILVA, J.B. A. Avaliação da qualidade da carne bovina in natura comercializada no município de Alexandria RN. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 327-331, 2014.

SOUZA, M.M.; CORREIA, M.M.F.; NASCIMENTO, R. A. Análise Microbiológica do Caranguejo Uçá, *Ucidescordatus* (Linnaeus, 1763), como bioindicador ambiental dos manguezais do Rio Paciência, Ilha de São Luís-MA. **Sociedade de Ecologia do Brasil**. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007.

STOLKER, A.A.M.; BRINKMAN, U.A.T. **Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in foodproducing animals - a review.**JChromatogr A, v.1067, p.15-53, 2005.

TORTORA. Gerard J. **Microbiologia** [recurso eletrônico] / Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case ; tradução: Aristóbolo Mendes da Silva ... [et al.] ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. – 12. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2016.