

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**DETECÇÃO DE INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM QUEIJO
TOFU**

THAÍS TERESA BRANDÃO CAVALHEIRO RIBEIRO

Orientadora: Prof. Dra. Marisa da Costa

Porto Alegre
Janeiro, 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**DETECÇÃO DE INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM QUEIJO
TOFU**

THAÍS TERESA BRANDÃO CAVALHEIRO RIBEIRO
Nutricionista – PUC/RS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Orientadora: Prof. Dra. Marisa da Costa

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Janeiro, 2016.

CIP - Catalogação na Publicação

Brandão Cavalheiro Ribeiro, Thais Teresa
Detecção de indicadores de contaminação em queijo
tofu / Thais Teresa Brandão Cavalheiro Ribeiro. --
2016.
35 f.

Orientador: Marisa Da Costa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Queijo de soja. 2. bactérias mesófilas. 3.
Coliformes. 4. Staphylococcus. 5. Coagulase. I. Da
Costa, Marisa, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força durante a minha jornada.

À Professora Dra. Marisa da Costa pela oportunidade e por me receber e acolher de braços abertos, pela orientação, pelo conhecimento imensamente compartilhado durante esse período.

Aos meus pais que tanto amo pelo incentivo e apoio, por me mostrarem que a disciplina e dedicação são de extrema importância para seguir com a vida.

Ao meu marido por sempre estar ao meu lado, compreendendo meus medos e angústias. Obrigado por acreditar em mim e pela força em todos os momentos.

Ao meu irmão e cunhada pelo incentivo.

À minha amiga e companheira de Laboratório Marciele Bogo que sempre está pronta a ajudar.

À todos os professores do PPGMAA que contribuíram com a minha formação.

Aos meus colegas de mestrado da turma 2014/1 pela amizade.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa de estudos.

À todos que direto ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

DETECÇÃO DE INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO EM QUEIJO TOFU

Autor: Thaís Teresa Brandão Cavalheiro Ribeiro

Orientadora: Prof. Dra. Marisa da Costa

RESUMO

Este estudo teve como objetivos avaliar a qualidade microbiológica de duas marcas de queijo tofu comercializadas em supermercado da cidade de Porto Alegre/RS. O queijo de soja foi primeiramente coletado e estocado refrigerado até chegar ao local de análise. Foram realizadas contagens de bactérias mesófilas, contagens e determinação de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo, contagens de coliformes a 35°C e a 45°C e confirmação de *Escherichia coli*, pesquisa de *Bacillus cereus*, de *Salmonella* sp. e de *Listeria* sp. Foi realizada a coleta de duas diferentes marcas, sendo um lote por mês, durante seis meses e foram analisadas cinco amostras de cada lote. Todas as amostras, de ambas as marcas, apresentaram unidades formadoras de colônia de mesófilos aeróbios acima de $4,3 \times 10^5$. Metade das amostras da marca A e 100% das amostras da marca B apresentaram a presença de coliformes a 45°C e acima dos limites preconizados pela legislação e a presença de *E. coli* foi confirmada nestas amostras. Também foi verificado que 83% dos queijos tofu de ambas as marcas possuíam contagens de unidades formadoras de colônia para *Staphylococcus* coagulase positivo acima do que a legislação preconiza (RDC 12 de 2001 da Anvisa). Em nenhuma das análises realizadas foi detectada a presença de *Salmonella* sp., *B. cereus* e *Listeria* sp. Estes resultados mostram que os queijos analisados estão sendo comercializados com composição inapropriada de microrganismos que são potencialmente debilitantes e causadores de infecções e ou intoxicações alimentares.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Janeiro, 2016.

DETECTION OF CONTAMINATION INDICATOR ON TOFU CHEESE ¹

Author: Thaís Teresa Brandão Cavalheiro Ribeiro

Advisor: Prof. Dra. Marisa da Costa

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of two different trade-mark of tofu cheese sold in Porto Alegre/RS supermarket. The soy cheese was first collected and stored refrigerated until the performing of of the analyses. It was performed mesophilic bacteria counts, *Staphylococcus* coagulase positive and negative counts, coliforms counts and confirmation of the presence of *Escherichia coli*, also, search of *Bacillus cereus*, *Salmonella* sp. and *Listeria* sp. It was collected two different trade-mark during six months, one trade-mark each month, and it was analyzed five samples of each trade-mark. It was found the presence of $\geq 4 \times 10^5$ units forming colonies of mesophilic bacteria in all samples of both trade-marks. Half the samples of the trade-mark A and 100% of the trade-mark B had fecal coliforms above the legal limits, and the presence of E. coli was confirmed in all those samples. It was also noticed that 83% of tofu samples, of both trade-mark, had coagulase positive *Staphylococcus* counts above the legal limit (RDC 12 de 2001 Anvisa). In conclusion this study showed that the tofu of both trade-marks analyzed had higher numbers of microorganisms dangerous for human health because they could cause infections and/or food poisoning.

¹Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.(35 p.) January, 2016.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Objetivos.....	2
2.1	Objetivo geral.....	2
2.2	Objetivos específicos.....	2
3	Revisão de literatura.....	3
3.1	Soja.....	3
3.2	Tipos de tofu.....	3
3.3	Processamento do tofu.....	4
3.4	Composição do tofu.....	5
3.5	Padrões microbiológicos para o queijo tofu segundo a legislação brasileira.....	5
3.5.1	Microrganismos indicadores.....	6
3.5.1.1	Microrganismos mesófilos.....	6
3.5.1.2	Coliformes.....	7
3.5.3.3	<i>Salmonella</i> sp.	8
3.5.4	<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e negativo.....	9
3.5.5	<i>Bacillus cereus</i>	10
3.5.6	<i>Listeria monocytogenes</i>	11
3.6	Queijo tofu como fonte de contaminação.....	12
4	Materiais e métodos.....	13
4.1	Amostras de tofu.....	13
4.2	Coleta das amostras.....	13
4.3	Preparo das amostras para as análises microbiológicas.....	13
4.3.1	Diluição das amostras.....	13
4.3.2.2	Contagem de mesófilos aeróbios.....	13
4.3.2.3	Contagem de coliformes a 35°C e a 45°C.....	14
4.3.2.4	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	14
4.3.5	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e negativo.....	15
4.3.6	Contagem e identificação de <i>Bacillus cereus</i>	15
4.3.7	Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	16
4.4	Análise estatística.....	16
5	Resultados.....	17
5.1	Contagem microbiológica no queijo tofu.....	17
5.2	Contagem de bactérias mesófilas.....	17
5.3	Contagem de coliformes a 35°C e a 45°C e presença de <i>Escherichia coli</i>	20
5.4	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e negativo.....	22
5.5	Contagem e identificação de <i>Salmonella</i> sp., <i>Bacillus cereus</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	24
6	Conclusões.....	27
7	Referências.....	28

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Soja – principais países produtores – safra 2009/10 a 2013/14 (em milhões de toneladas).....	3
Tabela 2 Padrões microbiológicos para tofu estabelecidos pela RDC 12/2001 da ANVISA.....	5
Tabela 3 Médias de contagem das unidade formadoras de colônias de mesófilos, coliformes 45°C e <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e negativo no queijo tofu da marca A.....	18
Tabela 4 Médias de contagem das unidade formadoras de colônias de mesófilos, coliformes 45°C e <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e negativo no queijo tofu da marca B.....	19
Tabela 5 Análise estatística de comparação entre médias das marcas avaliadas.....	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma do processo de produção do tofu.....	Página 4
--	-------------

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1. Médias de contagem de bactérias mesófilas, coliformes a 45°C e <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo no queijo tofu da marca A.....	20
Gráfico 2. Médias de contagem de bactérias mesófilas, coliformes a 45°C e <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo no queijo tofu da marca B.....	21
Gráfico 3. Análise qualitativa da presença de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e Coliformes a 45°C no queijo Tofu baseada nos limites estabelecidos pela RDC 12/2001 da Anvisa.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentual
°C	Graus Celcius
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de perigo e Pontos Críticos de Controle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
<i>et al.</i>	E colaboradores
g	Gramas
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mcg	Micrograma
mg	Miligrama
ml	Mililitro
PCA	Ágar Padrão para contagem
P/v	Por volume
UFC	Unidades Formadoras de colônias
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA	<i>United States Departamento of Agriculture</i>

1. INTRODUÇÃO

A soja tem um papel importante no Brasil devido à sua quantidade produzida, sendo boa parte desta produção feita no Rio Grande do Sul. A cultura de consumo de produtos a base desta leguminosa vem se tornando cada vez mais frequente nas mesas dos brasileiros devido ao seu valor nutricional, baixo custo de produção e proteínas que podem ser utilizadas como alternativa aos consumidores intolerantes à proteína animal.

Com o incremento da procura destes produtos á base de soja, cresce o interesse na manutenção da qualidade microbiológica destes alimentos. Isto porque os microrganismos presentes no alimento afetam diversos fatores como a vida de prateleira do produto, devido à presença de bactérias deteriorantes, possibilidade de produção de toxinas por estes microrganismos e até mesmo presença de microrganismos causadores de infecções graves, dependendo do estado imunitário do consumidor.

O tofu é um queijo originário da China, atualmente muito consumido pela Ásia Oriental, principalmente no Japão e cada vez mais consumido no Ocidente. Possui como ingredientes básicos: água, soja, cloreto de magnésio e sulfato de cálcio. A produção do queijo tofu geralmente utiliza o leite de soja como base para produção. Normalmente é consumido por pessoas que não querem ou não podem consumir leite de origem animal e derivados, porém, o consumo ainda restrito.

O seu processamento inicia através da obtenção do leite de soja, que é pasteurizado para a preparação do queijo. É um produto armazenado em embalagem a vácuo e um alimento com alta atividade de água, sendo um fator importante para proliferação de bactérias. Este queijo pode ser ingerido de diversas maneiras, dentre elas crua. Devido a este fator este alimento não pode ter presença de microrganismos potencialmente patógenos.

Existem poucos estudos sobre a qualidade microbiológica do tofu, sua microbiota e matérias primas. Por este motivo se torna importante a abordagem e conhecimento da qualidade microbiológica deste produto, que vêm sendo consumido pela população. A pesquisa de microrganismos indicadores e patógenos, como verificamos nesse estudo, serve como um alerta sobre a ausência de qualidade dos queijos tofu comercializados por duas empresas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a qualidade microbiológica do queijo tofu vendido em supermercado de Porto Alegre/RS.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Quantificar bactérias mesófilas aeróbias no queijo tofu

2.2.2 Quantificar coliformes a 35° e a 45°C e identificação de *Escherichia coli*

2.2.3 Determinar a presença de *Salmonella* sp. no queijo tofu

2.2.4 Quantificar *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo

2.2.5 Pesquisar *Bacillus cereus* no queijo tofu

2.2.6 Pesquisar *Listeria* sp. no queijo tofu

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Soja

A soja (*Glycine max*) é uma leguminosa, da família *Fabaceae* (L.) e vem ganhando cada vez mais espaço no Brasil, segundo maior produtor do mundo (Tabela 1). No Brasil são produzidos em média 88 milhões de toneladas do grão e o consumo interno é de 38,5 milhões de toneladas (USDA, 2013). O leite de soja e o queijo de soja (tofu) são os produtos derivados da soja mais consumidos no Brasil, mas por uma pequena parcela dos entrevistados e, produtos à base de soja, têm uma baixa frequência semanal de consumo (BEHRENS; SILVA, 2004; DEDANI et al. 2007). Os principais estados brasileiros produtores de soja são Mato grosso, Paraná e Rio Grande do Sul (CONAB, 2013).

A soja crua apresenta em sua composição a cada 100g 395kcal, 30g de glicídeos, 36,1g de proteínas, 17,7g de lipídeos, 226mg de cálcio, 546mg de fósforo, 8.8mg de ferro e não possui colesterol (FRANCO, 2008).

TABELA 1: Soja – principais países produtores – safra 2009/10 a 2013/14 (em milhões de toneladas).

Países	Biênio				
	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14
EUA	91,42	90,61	84,19	82,56	88,66
BRASIL	69,00	75,30	66,50	82,00	88,00
ARGENTINA	54,50	49,00	40,10	49,30	53,50
CHINA	14,98	15,10	14,48	12,80	12,20
ÍNDIA	9,70	9,80	11,00	11,50	11,80
PARAGUAI	6,46	7,13	4,04	9,37	9,00
CANADÁ	3,58	4,45	4,30	4,93	4,80
OUTROS	10,77	12,54	14,54	15,42	15,58
TOTAL	260,40	263,92	239,15	267,88	283,54

Fonte: USDA, 2013.

*Milhões de toneladas

3.2 Tipos de tofu

O queijo tofu possui quatro consistências, sendo diferenciados principalmente pelo teor de proteína, como segue (TOFU STANDARDS, 1986):

- Macio: 5.0% – 6,4% de proteína
- Regular: 6,5% – 9,4% de proteína
- Firme: 9,5% – 13,9% de proteína
- Extra firme: Acima de 14% proteína

3.3 Processamento do tofu

O queijo de soja tofu é feito após a obtenção do leite de soja. Este é aquecido, filtrado e coagulado para obtenção da massa de soja e após é feito prensagem (RECKA, 2010). Abaixo (figura 1) está o fluxograma de produção do queijo tofu, obtido através da coagulação do leite de soja:

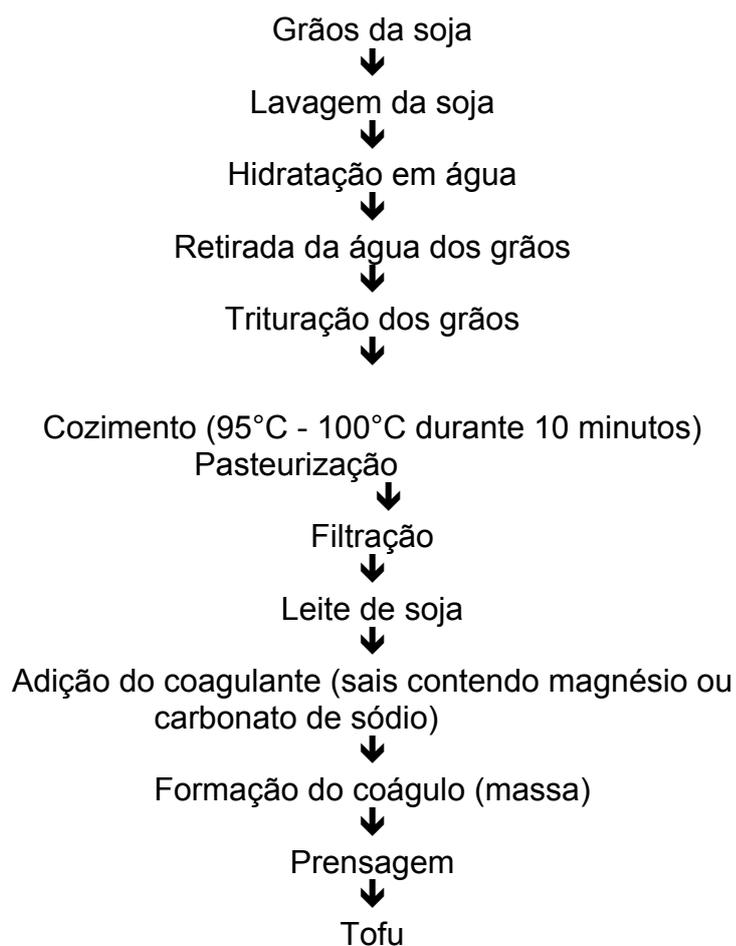


Figura 1: Fluxograma do processo de produção do tofu

Fonte: (WANG, 1986; BERK, 1992; RECKA, 2010; PAULLETTO; FOGAÇA, 2012).

3.4 Composição do tofu

A composição do tofu depende da forma de fabricação (proporção de soja, água, tipo de coagulante). O tofu pode variar de 50 a 88% de água. Segundo Franco (2008) a composição para cada 100g de tofu é de 26,70g de proteínas, 10,40 de lipídeos, 4mcg de retinol, 60mcg de tiamina, 140mcg de riboflavina e 0,500mg de niacina (200,4 Kcal). O teor de proteína do tofu é variável de acordo com a consistência que o fabricante deseja obter (TOFU STANDARTS, 1986).

3.5 Padrões microbiológicos para o Tofu segundo a legislação brasileira

A presença dos microrganismos nos alimentos é o resultado de diversos fatores, como os cuidados desde a compra da matéria prima até a fabricação, conservação, transporte do alimento produzido, etc. (NERO, 2005). Para garantir à população a qualidade dos produtos, a produção dos alimentos deve ser feita de maneira correta seguindo os protocolos de boas práticas de fabricação. A legislação que estabelece os parâmetros microbiológicos para o queijo de soja (tofu), vigente no Brasil, é a Resolução-RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001. Os limites estabelecidos pela legislação estão na tabela abaixo (Brasil, 2001a).

TABELA 2: Padrões microbiológicos para tofu estabelecidos pela RDC 12/2001 da ANVISA.

Microrganismo	Padrão microbiológico (RDC 12/2001) ANVISA – em 25g
Coliformes a 45 °C	Máximo de 10 ² UFC/g
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	Máximo de 5x10 ³ UFC/g
<i>Bacillus cereus</i>	Máximo de 5x10 ³ UFC/g
<i>Listeria</i> sp.	Ausência

Fonte: Brasil, 2001a.

Não existe legislação vigente com padrões estabelecidos para contagem de microrganismos mesófilos em tofu, porém é sabido que alimentos destinados ao consumo humano com mais de 10^6 UFC/g devem ser considerados suspeitos pois há uma possibilidade de ter presença de microrganismos patógenos ou deteriorantes no alimento. Deve ser levado em conta também se o alimento é obtido pela ação microbiana, pois o resultado da análise pode ser confundido com algum tipo de microrganismo adicionado para a fabricação do queijo (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Como exemplo pode-se citar a legislação para leite materno de banco de leite onde o limite é de até 10^2 unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) de mesófilos aeróbios e a de bebida láctea pasteurizada de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL (BRASIL, 2001b; BRASIL, 2005).

3.5.1 Microrganismos indicadores

Os microrganismos indicadores nada mais são que grupos ou espécies de microrganismos que podem indicar a qualidade da higiene ao longo do processo e, quando presentes, são os que indicam a possibilidade da presença de algum outro microrganismo com potencial de patógeno, indicativo de deterioração no alimento, condições de processamento inadequadas, ou até mesmo contaminação de origem fecal, como a *Salmonella* sp. e os coliformes fecais (FRANCO; LANDGRAF, 1996). Devido à grande importância da detecção de microrganismos nos alimentos, levando-se em conta que alimentos podem ser facilmente contaminados na natureza, manipulação ou durante o seu processamento, o controle de microrganismos indicadores é fundamental para assegurar a inoquidade do alimento.

3.5.1.1 Microrganismos mesófilos

Segundo Jay (2005) os mesófilos são caracterizados por um grupo de microrganismos que se desenvolvem em temperaturas entre 20°C e 45°C e com temperatura ótima para multiplicação entre 30°C a 40°C . A realização da contagem de microrganismos mesófilos é um método geralmente utilizado para indicar populações bacterianas em alimentos e sem a necessidade de diferenciar estes microrganismos. Se presentes em altas contagens podem indicar alguma falha na

sanitização, controle de processos ou na matéria prima (SILVA et al., 1997). A temperatura, processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento também são fatores importantes na multiplicação destes microrganismos e importantes para a determinação da vida útil e da qualidade do produto (ICMSF, 1984).

As bactérias presentes nos alimentos podem desencadear a deterioração do alimento ou diminuição da vida de prateleira, seja agente patógeno ou não. Deste modo a higiene do local de produção e dos alimentos é de fundamental importância para garantir a segurança dos alimentos (CORTEZ, 2003). Não existe legislação para contagem de mesófilos para queijo Tofu. No entanto de acordo com a Public Health Laboratory Service (PHLS, 2000) a aceitação do produto está relacionada com a presença de mesófilos, que influenciam na aparência, cheiro e textura do produto.

3.5.1.2 Coliformes

O grupo de coliformes é considerado um indicador de condições higiênicas do alimento ou ambiental (MELLO, 2012). Os coliformes são bactérias Gram negativas, não esporuladas, que fermentam a lactose, produzem gás e são aeróbias ou anaeróbias facultativas (SILVA et al., 2007). Estes microrganismos estão presentes em diversos lugares, dentre eles na água, solo, ar, poeira e nos intestinos de animais, inclusive do homem.

A análise de coliformes é normalmente utilizada para avaliar as condições higiênico sanitárias de alimentos que são tratadas com processos térmicos. Os coliformes podem ser facilmente eliminados por tratamento térmico. A contagem deste microrganismo no produto é um indicativo para possível contaminação pós processamento (SOUZA, 2006; FORSYTHE, 2013).

A pesquisa de coliformes é dividida em duas categorias: coliformes a 35°C (totais) que são um indicativo de contaminação ambiental e coliformes 45°C (fecais) cujo o indicador principal é a *Escherichia coli* e que são indicadores de contaminação fecal (FRANCO; LANGRAF, 1996; MAIESKI, 2011). A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, não forma endósporos e é anaeróbia facultativa. Ela pode ser encontrada como contaminante em produtos lácteos, carnes fermentadas secas, linguiças, frutas e vegetais crus e minimamente processados

(FORSYTHE, 2013). Os coliformes 45°C produzem gás a 45°C após 24 a 48 horas de cultivo, em média. A contagem deste microrganismo acima do padrões estabelecidos pela legislação é um indicativo de condições inadequadas de processamento (SILVA et al., 2007; FONTÁN et al., 2001). A *Escherichia coli*, por exemplo, representa 13,3% dos casos de surtos alimentares no Brasil, se classificando em 3º lugar entre os microrganismos causadores de surtos alimentares de DTA (BRASIL, 2014).

3.5.3.3 *Salmonella* sp.

A *Salmonella* sp. é uma enterobactéria Gram negativa, móvel, não esporulada, anaeróbia facultativa, tem como temperatura ótima de crescimento 38°C e mínima de 5°C, porém não é fermentadora da lactose. Como não produzem endósporos, são termossensíveis e podem ser eliminadas a 60°C durante 15 a 20 minutos (BRENNER; FARMER, 2005; FORSYTHE, 2013).

A salmonela é uma bactéria patogênica e por isso tem grande importância para saúde pública. É responsável por graves infecções de origem alimentar e, acredita-se que a maioria dos surtos não são notificados. Alguns casos necessitam de internação e pode causar mortalidade e perdas vários prejuízos também econômicos (SANTOS et al., 2002; GERMANO, 1993).

As cepas que estão mais envolvidas em casos de surtos alimentares em humanos são as *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, e que possui como habitat o trato gastrointestinal de animais com sangue quente (SILVA et al., 2007). A *Salmonella* pode causar gastroenterites, febre entérica e doença sistêmica invasiva. A maioria das infecções por esta bactéria são de origem alimentar, a partir de contaminação de produtos derivados de leite ou cárneos, podendo ser encontrada também em água, solo, superfícies de equipamentos e utensílios. A infecção começa com os sintomas (dor abdominal, fezes com sangue, calafrios, desidratação, diarreia, febre, cefaleia e vômito) entre 6 e 48 horas, podendo persistir de 4 a 7 dias (FORSYTHE, 2013; SILVA et al., 2007).

Diversos fatores são responsáveis pelo aumento da frequência de doenças veiculadas por alimentos, dentre elas podemos destacar a existência dos grupos vulneráveis, imunocomprometidos, crescimento desordenado da população e a produção de alimentos em larga escala (BRASIL, 2002). A *Salmonella* sp. foi o

agente etiológico associado em maior número aos surtos alimentares de DTA no Brasil no período de 2000 a 2014. Porém os surtos vêm diminuindo ao longo do tempo, por exemplo, no ano de 2000 foram 140 casos de surtos alimentares associados a esta bactéria, já em 2014 foram apenas 4 (BRASIL, 2014).

3.5.4 *Staphylococcus coagulase positivo*

O gênero *Staphylococcus* é composto por 52 espécies e 28 subespécies (LPSN, 2015a). Os mais importantes em microbiologia de alimentos são: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus chromogenes* porque são os mais frequentes causadores de intoxicações. Todas estas bactérias são comumente encontradas na natureza, pele e mucosas de mamíferos (MURRAY, 1999; STAMFORD et al., 2006). Dentre estas espécies destaca-se o *Staphylococcus aureus*, principal espécie classificada como estafilococos coagulase positiva (SCP). Esta bactéria possui grande importância epidemiológica, pois tem alta prevalência nos alimentos contaminados sendo produtora de toxinas, que são causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONI, 2000). Os vários alimentos que podemos destacar como fonte de contaminação são os produtos lácteos como queijos, leites e manteigas, produtos de confeitaria e carnes (PEREIRA et al., 2001).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva, mesófila, não esporulada, halófila tolerante, podendo ser encontrada nas fossas nasais e mãos de alguns manipuladores de alimentos, podendo estes manipuladores ser fonte de contaminação do alimento (RADDI et al., 1988; SANTOS et al., 2007).

A presença de estafilococos pode ser detectada na maioria dos alimentos que são manipulados, refrigerados inadequadamente, preparados com muita antecedência ou até mesmo em produtos que não sofreram tratamento térmico de forma suficiente. Este microrganismo pode causar uma intoxicação, que desencadeia diversos sintomas em até quatro horas após o consumo como náuseas, câibras abdominais agudas, diarreia, dores de cabeça, sudorese e queda na temperatura corporal (JAY, 2005).

Dentre o estafilococos existe também o grupo classificado com coagulase negativo (SCN), porém a legislação para queijo tofu solicita apenas a análise de *Staphylococcus* coagulase positivo. Devemos ressaltar a importância deste

microrganismo pois ele também pode ser produtor de enterotoxina. Por exemplo FLEMING *et al.* (2010), trabalhando com queijo de origem bovina, encontrou SCN na maioria dos queijos testados e, em 50% das amostras, também foi observado contagens superiores de SCN em relação aos SCP nas amostras que estavam fora dos padrões sanitários. Os SCN também possuem genes de enterotoxinas e já há relato de intoxicação alimentar por SCN (CARMO *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2006; MELLO *et al.*, 2014; PODKOWIK *et al.*, 2013). Apesar desta capacidade de produção de enterotoxinas estar presente, a proporção de relatos de intoxicações por estafilococos tem sido relacionada predominantemente com os SCP.

3.5.5 *Bacillus cereus*

Dentre as espécies existentes do gênero *Bacillus*, a mais relevante na produção de alimentos é o *Bacillus cereus*, uma bactéria esporulada. Estas bactérias produzem toxinas e enzimas que tornam-as patogênicas determinando o potencial de deterioração do alimento. Esta bactéria é resistente a tratamentos térmicos, como por exemplo o UHT (*ultra high temperature*) e a pasteurização (FOSCHINO *et al.*, 1990; COSENTINO *et al.*, 1997; MONTANHINI *et al.*, 2012).

O *B. cereus* é um bastonete Gram positivo, encontrado principalmente na natureza e no ambiente (MONTVILLE; MATTHEWS, 2008). Pode ser comumente encontrado em produtos cozidos, saladas, cereais e derivados, produtos lácteos, cárneos, alimentos desidratados e especiarias. O cozimento pode ativar os esporos presentes nos alimentos, e caso a refrigeração não for feita de maneira adequada, os esporos podem germinar e ocorrer a produção toxinas (CHEN *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2007). A presença desta bactéria no alimento pode ser indicativo de problemas com a contaminação da matéria prima ou até problemas de higiene durante a processamento do alimento (DUFRENNE *et al.*, 1994).

O presença de *B. cereus* pode estar associada à deterioração dos alimentos ou como causador de toxinfecções de origem alimentar (CONSENTINO *et al.*, 1997). Ela é causadora de duas síndromes: emética e diarreica. Na síndrome emética a toxina é pré formada no alimento, já na síndrome diarreica a toxina é normalmente produzida no trato intestinal (GRANUM; LUND, 1997; KRAMER; GILBERT, 1989). A síndrome alimentar diarreica tem como sintomas diarreia aquosa, cólicas e dores abdominais, náuseas e raramente vômitos e possuem

duração de 12 a 24 horas. A emética causa náuseas, vômitos, cólicas abdominais e pode causar diarreia, durando de 6 a 24 horas. Elas são causadas quando a dose de microrganismo presente está entre $10^5 - 10^7$ células/g para síndrome alimentar diarreica e entre $10^5 - 10^8$ células/g na síndrome emética (FORSYTHE, 2013).

3.5.6 *Listeria monocytogenes*

Existem 19 espécies e seis subespécies de *Listeria* (LPSN, 2015b). Dentre elas a *Listeria monocytogenes* é considerada a mais importante para a indústria de alimentos e para as pessoas devido à sua patogenicidade (FARBER; PETERKIN 1991). A *Listeria* sp. está distribuída por todo ambiente na natureza, podendo ser encontrada no solo, em diversos vegetais, na água e no trato intestinal de animais (AURELI et al., 2003).

Para indústria de alimentos diversos fatores são importantes para a eliminação desta bactéria no ambiente, como a umidade, temperatura e material orgânico nos locais de processamento, levando em conta que este patógeno é produtor de biofilmes e pode colonizar os equipamentos (UHITIL et al., 2004). O parâmetro microbiológico para alimentos deste microrganismo é de ausência (BRASIL, 2001a).

A *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, não esporulada, móvel e anaeróbia facultativa (MONTVILLE; MATTHEWS, 2008). Em alimentos já foi encontrada em queijos, produtos cárneos e vegetais (JAY, 2005; ZAFFARI et al., 2007). Esta bactéria pode se multiplicar em uma faixa extensa de temperatura (entre 0°C e 45°C) e de diferentes pH (entre 4.4 e 9.4) (WHO, 2004). Esta característica favorece o crescimento desta bactéria em alimentos conservados sob refrigeração. Diversos surtos de listeriose já foram descritos em produtos derivados do leite, dentre eles podemos destacar leites pasteurizados pós processamento e queijos macios (RYSER; DONNELLY, 2001; BARANCELLI et al., 2011).

Este microrganismo, agente etiológico da listeriose, pode causar abortos, meningite, sepse e até a morte. Essa doença costuma atingir pessoas como imunocomprometidos, crianças, idosos e grávidas (FARBER; PETERKIN, 1991). A intensidade e gravidade da listeriose depende das condições imunológicas do indivíduo e da quantidade de bactéria ingerida (ROCOUR, 1996). Devido aos diversos casos de listeriose notificados desde os anos 80 o interesse em estudos de

isolamento de *Listeria* sp. em produtos de origem alimentar vem aumentando (FARBER; PETERKIN, 1991; OLIVEIRA, 1999).

3.6 Queijo tofu como fonte de contaminação

Existem diversas bactérias que podem ser fonte de contaminação no tofu já que ele tem como matéria prima a soja que é um produto que vem do solo, é manipulado e passa por diversas etapas até o produto final. Dentre estas bactérias podemos citar o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus* sp. (DANIYAN, 2011).

O queijo tofu por possuir alta atividade de água é um produto muito suscetível ao crescimento de microrganismos, principalmente se ocorrerem problemas durante a sua fabricação (CAI; CHANG 1999). Alguns autores relataram encontrar bactérias patogênicas no tofu e inclusive no leite de soja que é a base para produção do queijo de soja. Benedetti e Falcão (2003), por exemplo, encontraram coliformes totais e fecais no leite de soja e concluíram que a contaminação foi proveniente da tubulação do setor de aquecimento do pasteurizador. Kooij e Boer (1985) obtiveram contagens de *S. aureus* de até 10^5 UFC/g nas amostras de tofu analisadas. Mallet e colaboradores (2007) encontraram *B. cereus*, bactérias psicrótróficas, *Staphylococcus* coagulase positivo e coliformes no seu estudo com tofu. Também foi relatada a contagem de bolores e leveduras por Rekha (2010).

As contaminações em alimentos podem causar as chamadas enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs). Essas ETAs podem causar diversos prejuízos como despesas com tratamentos médicos, queda da produtividade do doente e consequências macro econômicas (BRASIL, 2001b).

Em face destas informações nosso trabalho visa verificar a qualidade microbiológica do queijo tofu industrializado, comercializado em Porto Alegre/RS. Para tanto foram pesquisados os seguintes microrganismos indicadores e patógenos: mesófilos aeróbios, coliformes a 35° e a 45°, salmonela, estafilococos coagulase positivo e negativo, *B. cereus* e *L. monocytogenes*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de tofu

Foram realizadas coletas de amostras de produtos comerciais de duas empresas tradicionais, nomeadas A e B, produtoras de tofu sem condimentos. O total de cinco unidades foram obtidas de um mesmo lote, por marca, em cada mês, durante seis meses (novembro a abril); totalizando 10 amostras por mês. Os pontos de aquisição foi um supermercado de grande porte de Porto Alegre/RS. Para análise dos resultados foi utilizada a RDC 12 da ANVISA de 2001 (BRASIL, 2001) Os queijos foram classificados conforme a consistência e análise sensorial na abertura dos invólucros (TOFU STANDART, 1986).

4.2 Coleta das amostras

Para a coleta das amostras foram observadas as datas de fabricação, prazo de validade e o número do lote. Somente amostras dentro da validade foram coletadas. As amostras foram imediatamente encaminhadas ao laboratório, devidamente refrigeradas, e analisadas em no máximo 24h.

4.3 Preparo das amostras para as análises microbiológicas

4.3.1- Diluição das amostras

Para cada amostra, foi retirada, de forma asséptica, a camada mais externa do produto. Um volume de 25g da parte interna do produto de cada amostra de tofu foi pesada, homogeneizado em 225mL de salina peptonada, 0,1% (p/v) para a obtenção da diluição 10^{-1} . A partir desta diluição, as demais diluições decimais (10^{-2} a 10^{-5}) foram realizadas (SILVA, et al., 2007).

4.3.2.2- Contagem de mesófilos aeróbios

A contagem de mesófilos aeróbios foi realizada em duplicata através da técnica de profundidade com a inoculação de 1 mL de cada diluição seriada em Ágar

padrão para Contagem. As placas foram incubadas à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Após o período de incubação, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) presentes. O resultado foi expresso em UFC/g do produto (SILVA, et al., 2007).

4.3.2.3- Contagem de coliformes a 35°C e a 45°C e confirmação de *E. coli*

A contagem de coliformes a 35°C foi realizada com Ágar Cristal Violeta Vermelho Bile (VRBA) segundo SILVA et al., (2003). O resultado foi expresso em UFC/g do produto. A confirmação de coliformes a 45°C foi realizada pela inoculação de cinco colônias suspeitas em Caldo verde brilhante bile 2% e a confirmação de coliformes 45°C foi feita em caldo *Escherichia coli* (EC) através da inoculação de cinco colônias típicas do ágar cristal violeta vermelho bile. Os tubos inoculados foram incubados a 35°C e a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ respectivamente durante 48 horas em banho de água sob agitação, sendo considerados positivos os tubos que apresentaram crescimento com formação de gás.

Foi realizado o isolamento duas vezes consecutivas em ágar infusão de cérebro e coração e para confirmação de *Escherichia coli* foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: Catalase, oxidase, oxidação e fermentação da glicose, citrato, indol, vermelho de metila e Voges-Proskauer. Como controle positivo foi usado a bactéria *Escherichia coli* ATCC 10536.

4.3.2.4– Pesquisa de *Salmonella* sp.

Para a pesquisa de salmonela foi utilizado 25g da amostra para a etapa de pré- enriquecimento em 225 mL de Caldo Lactosado e incubação a 35°C por 24 horas. Para o enriquecimento seletivo foi utilizado Caldo Selenito Cistina e Caldo Rappaport-Vassiliadis com a utilização de alíquotas de 0,1 mL do pré-enriquecimento, com incubação a 42°C por 24 horas. Após incubação, alíquotas foram semeadas em Ágar-Xilose-Lisina-Desoxisolato (XLD) e Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol lactose sacarose (BLPS) e incubadas à 35°C por 24 horas. Após o período de incubação foi verificado o desenvolvimento de colônias típicas (vermelho-amareladas com centros pretos – XLD e colônias esbranquiçadas com

halos vermelhos- BLPS) de *Salmonella* sp. (SILVA et al., 2007). Para controle positivo foi utilizada a bactéria *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

4.3.5 Contagem e identificação de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo

Para a contagem de *Staphylococcus* sp., alíquotas correspondentes a 0,1 mL de cada diluição seriada foi semeada em Ágar-Baird Parker suplementado com solução de gema de ovo e telurito de potássio. As placas foram incubadas a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 a 48 horas (SILVA et al., 2007).

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias típicas e atípicas de estafilococos coagulase positivo e negativo presentes. O resultado foi expresso em UFC/g do produto.

Para a identificação dos *Staphylococcus* sp. foram selecionadas três a cinco colônias típicas (as colônias típicas eram acinzentadas a preto, circular, com halo em volta) e atípicas do Ágar Baird-Parker que foram reisoladas em ágar BHI e incubadas a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h. Foram verificadas as seguintes características: morfologia de colônia, coloração de Gram e testes bioquímicos (catalase, oxidase, oxidação e fermentação da glicose, fermentação do manitol, pesquisa de termonuclease e coagulase em tubo) (MACFADDIN, 2000; SILVA, et al., 2007). Após a realização dos testes, os isolados foram identificados como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN). Para controle positivo foi utilizada a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.3.6 Contagem e Identificação de *Bacillus cereus*

A metodologia utilizada para a avaliação de *B.b cereus* foi executada conforme SILVA et al., 2007. A avaliação quantitativa de *B. cereus* foi realizada através da semeadura das diluições em meio seletivo ágar cereus (PEMBA). Após incubação a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 a 48 horas, foi avaliada a presença de *B. cereus* através do crescimento de colônia típica (colônia turquesa/azul com halo opaco). Como controle positivo foi utilizada a bactéria *B. cereus* isolada no laboratório de bacteriologia da UFRGS.

4.3.7– Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Para pesquisa de *L. monocytogenes* foi utilizado 25 gramas da amostra adicionado em 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* Tamponado (BLED) e incubado a 30°C por 30h. O isolamento foi realizado em Ágar Oxford (OXA) e Palcam adicionados de agente seletivo, incubação à 30°C por 48 horas com posterior identificação das colônias típicas (colônias negras-Oxford e colônias acinzentadas a verdes rodeadas de halos marrom escuro a negro). A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizado segundo Método do *Bacteriological Analytical Manual Online* da *Food and Drug Administration* (HITCHINS, 2003). Para controle positivo foi utilizada a bactéria *L. monocytogenes* ATCC7644.

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos com as análises do tofu foram analisados separadamente e expressos em porcentagem e média. A contagem de microrganismos entre os lotes das duas diferentes marcas foi submetida ao teste de comparação entre médias (Tukey), adotando o nível de significância de 0,05%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagens microbiológicas no Tofu

Foram coletadas e analisadas 60 amostras de queijo tipo Tofu, distribuídas em 12 coletas; quatro (33%) na primavera, seis (50%) no verão e duas (17%) no inverno. Todas as amostras estavam sob refrigeração no momento da coleta. O tempo de prateleira no momento da coleta era de no máximo três semanas, tendo em vista que o prazo de validade é de 3 meses, em média. Os queijos tofu analisados se encaixaram no perfil de tipo macio devido ao seu teor de proteína que foi igual a 6,4.

5.2 Contagem de bactérias mesófilas aeróbias

Todas as amostras analisadas apresentaram contagem de bactérias mesófilas aeróbias de no mínimo $4,3 \times 10^5$ UFC/g. As médias de contagem das bactérias mesófilas estão apresentadas nas tabelas 3 e 4, variaram entre $4,3 \times 10^5$ e $9,1 \times 10^6$ UFC/g. As médias dos lotes não apresentaram diferença significativa, ou seja, indicando que não houve diferença nas contagens nos diferentes meses conforme tabela 5.

Os resultados obtidos na quantificação das bactérias mesófilas são semelhantes ao verificados por Kooij; Boer (1985) que obtiveram contagens maiores que 10^6 UFC/g em 95% das amostras de tofu analisadas. Em Munique, Alemanha, Ashenafi (1994) observou contagens muito altas (10^5) de bactérias mesófilas nos tofus comercializados nos mercados locais. Este autor pode correlacionar as altas contagens bacterianas no tofu com a manipulação ao longo da sua produção, pois ao fazer contagens com o leite de soja utilizado na produção destes queijos as contagens eram bem inferiores.

A contagem de mesófilos aeróbios em placa é o método mais utilizado como indicativo em geral das populações bacterianas nos alimentos. Esta análise não diferencia o tipo de bactéria, é utilizada apenas para obter informações sobre todo o processo como qualidade dos produtos, condições adequada de processamento, manipulação e vida de prateleira (SILVA et al., 2007).

Os valores obtidos no presente trabalho devem ter uma atenção especial já que vários lotes apresentaram valores em torno de 10^6 que é superior a vários

limites estabelecidos para outros alimentos já que não há legislação específica para mesófilos em tofu.

Tabela 3: Médias de contagem das unidades formadoras de colônias de mesófilos aeróbios, coliformes a 35°C e 45°C e *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo no queijo tofu da marca A

Lote	Mesófilos	Coliformes		SCP ¹	SCN ²
		35°C	45°C		
1 (03/11/14)	3.3x10 ⁶ ⁵	3.5x10 ⁴	0.2x10⁴ ⁴	3.3x10 ³	5.3x10 ³
2 (08/12/14)	4.3x10 ⁵	3.2x10 ¹	NE ⁶	3.4x10 ³	6.2x0 ³
3 (16/01/15)	4.5x10 ⁵	3.7x10 ¹	NE	5.7x10 ¹	7.2x10 ¹
4 (02/02/15)	7.2x10 ⁶	8.3x10 ⁵	6x10⁵	5.5x10⁴	6.1x10 ⁴
5 (02/03/15)	9.1x10 ⁶	3.5x10 ¹	NE	5.2x10⁴	6.8x10 ⁴
6 (06/04/15)	7.2x10 ⁶	7.9x10 ⁵	5.6x10⁵	NE	3.4x10 ¹

1: SCP: *Staphylococcus* coagulase positivo; 2: SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo; 3: Média de 5 amostras; 4: Negrito indica lotes acima do permitido pela legislação; 5: Diferentes letras indicam diferença estatística

6: NE: Não encontrado

Comparando com parâmetros para estes outros alimentos cuja contagem possui limites máximos, os valores encontrados neste trabalho são superiores aos limites de 10² UFC/mL de mesófilos aeróbios em leite materno de banco de leite e de 1,5x10⁵ UFC/mL para bebidas lácteas pasteurizadas (BRASIL, 2001; Brasil, 2005). Também estes valores superiores à recomendação feita pela "*The soyfood association of America*" (TOFU STANDARDS, 1986) para leite de soja, que era de que este alimento não poderia apresentar contagens de bactérias mesófilas acima de 2 x10⁴ UFC/mL para ser admitido para o consumo.

Devido à ausência de um padrão de contagem de mesófilos aeróbios para o tofu foram feitas também análises dos produtos em relação à aparência, o cheiro e a textura. Todas as amostras apresentaram as mesmas características: aparência boa, queijo branco com liquido levemente amarelado, cheiro normal e textura macia. Assim, embora com uma alta carga de bactérias mesófilas aeróbias o alimento não

apresentava aspecto que demonstrasse deterioração, muito provavelmente devido a manutenção deste alimento na refrigeração.

Tabela 4: Médias de contagem das unidades formadoras de colônias de mesófilos aeróbios, coliformes a 35°C e 45°C e *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo no queijo tofu da marca B

Lote	Mesófilos	Coliformes	Coliformes	SCP ¹	SCN ²
		35°C	45°C		
1 (10/11/14)	5.3x10 ⁶	6.2x10 ⁵	4.4x10⁵ ⁴	4.5x10⁴	6.3 x10 ⁴
2 (08/12/14)	6.3x10 ⁵	7.1x10 ⁴	4.2x10⁴	3.6x10 ³	4.1 x10 ³
3 (26/01/15)	4.8x10 ⁶	7.3x10 ⁵	6.5x10⁵	4.1x10⁴	5.1 x10 ⁴
4 (09/02/15)	5.3x10 ⁶	5.7x10 ⁵	3.3x10⁵	4x10⁴	4.7 x10 ⁴
5 (09/03/15)	7.4x10 ⁶	8.2x10 ⁵	3.7x10⁵	NE ⁵	3.7 x10 ¹
6 (13/04/15)	8.2x10 ⁶	7.9x10 ⁵	3.7x10⁵	3.5x10⁴	3.9 x10 ⁴

1: SCP: *Staphylococcus* coagulase positivo; 2: SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo; 3: Média de 5 amostras; 4: Negrito indica lotes acima do permitido pela legislação; 5: NE: Não encontrado

Tabela 5: Análise estatística de comparação entre médias das marcas avaliadas

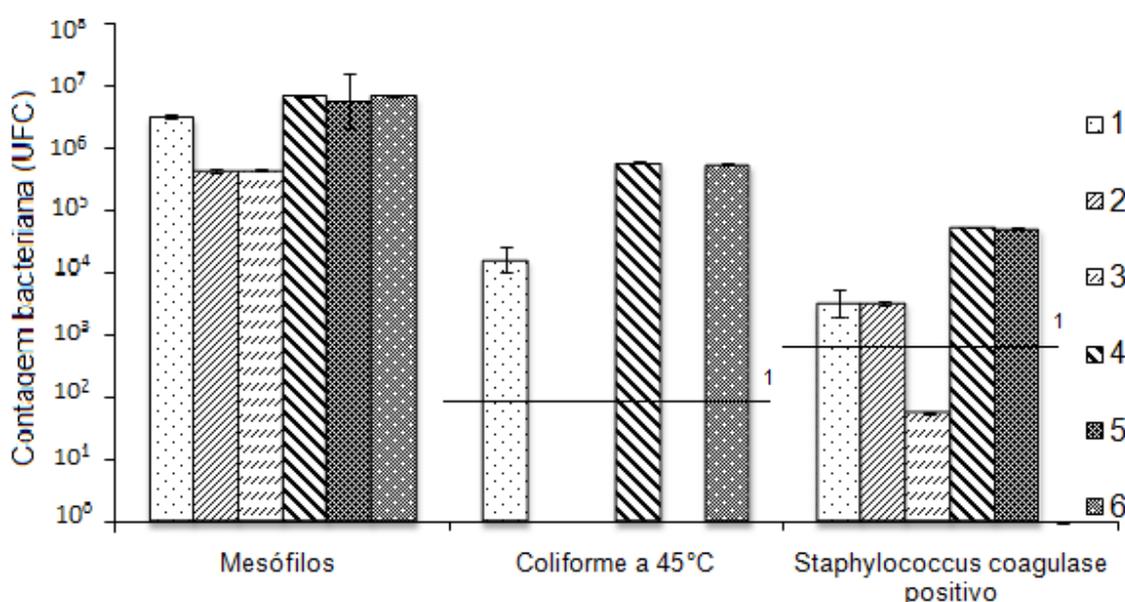
Marca	UFC/g				
	Bactérias mesófilas	Coliformes a 35°C	Coliformes a 45°C	SCP ¹	SPN ²
A	4,6x10 ⁶ ± 3.3a	2,7x10 ⁵ ± 3.5a	1,9x10 ⁵ ± 2.5a	1,8x10 ⁴ ± 2.3a	2,3x10 ⁴ ± 2.7a
B	5,2x10 ⁶ ± 1.7a	6,0x10 ⁵ ± 1.8a	3,6x10 ⁵ ± 1.2a	2,7x10 ⁴ ± 1.7a	3,4x10 ⁴ ± 2.1a

1: SCP: *Staphylococcus* coagulase positivo; 2: SCN: *Staphylococcus* coagulase negativo

5.3- Contagem de Coliformes a 35°C e a 45°C e presença de *Escherichia coli*:

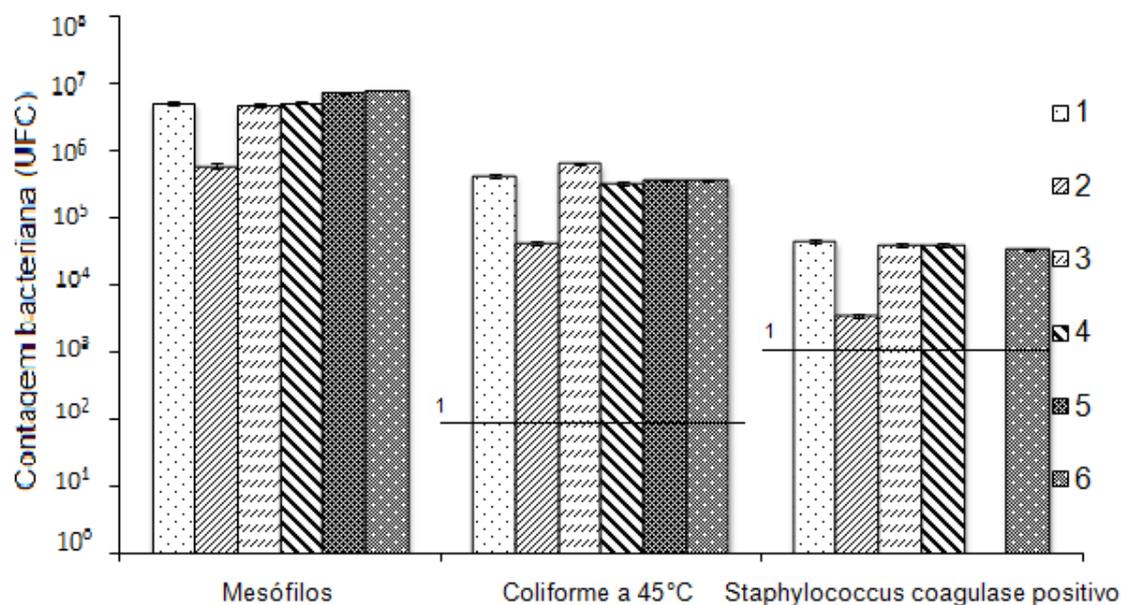
As médias de UFC de ambas as marcas ficaram entre $0,2 \times 10^4$ e $6,5 \times 10^5$ UFC/mL (Tabelas 3 e 4). Das 30 amostras da marca A, 15 apresentaram contagem de coliformes a 45°C com no mínimo $0,2 \times 10^4$ UFC/g, ou seja, estavam impróprias para consumo. Todas as amostras da marca B apresentaram contagem de coliformes a 45°C, acima de $4,2 \times 10^4$ UFC/g, ou seja, também estavam impróprios para consumo. Os resultados são mostrados nos gráficos 1 e 2 onde podemos observar que a grande maioria dos lotes ultrapassou os limites máximos exigidos pela legislação brasileira. Em todos os lotes onde houve quantificação de coliformes a 45° foi confirmado presença de *Escherichia coli*. Todas as cepas confirmadas como *Escherichia coli* apresentaram resultado positivo para os testes de catalase, Oxidação e fermentação da glicose (OF), indol e Vermelho de Metila e negativo para coloração de Gram, teste da oxidase, teste do citrato e Voges Proskauer.

Gráfico 1: Médias de contagem de bactérias mesófilas aeróbias, coliformes a 45°C e *Staphylococcus coagulase positivo* no queijo tofu da marca A



1. Linhas mostrando os limites máximos tolerados pela RDC 12 (Brasil, 2001); 2. Coag. + = coagulase positivo.

Gráfico 2: Médias de contagem de bactérias mesófilas aeróbias, coliformes a 45°C e *Staphylococcus coagulase positivo* no queijo tofu da marca B



1. Linhas mostrando os limites máximos tolerados pela RDC 12 (Brasil, 2001); 2. Coag. + = coagulase positivo.

Segundo os parâmetros microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente no Brasil, a resolução RDC N°12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA três dos seis lotes de tofu da marca A e os seis lotes analisados da marca B apresentam contagem acima do permitido para consumo. As causas destas quantificações fora do limite estabelecido pela legislação podem ser devido a pasteurização inadequada do leite de soja, a contaminação durante o processo de produção de queijo ou até mesmo na manipulação e embalagem dos mesmos. Este resultado indica falhas graves de higiene na produção deste alimento, pois a presença de *Escherichia coli* está diretamente ligada com origem fecal. A marca A e B não apresentaram diferença significativa entre médias ($p < 0,05$) na contagem de coliformes 45° o que mostra que não houve uma variação entre as contagens durante alguns meses.

Podemos observar nas tabelas 3 e 4 que os resultados obtidos no nosso trabalho corroboram com os achados de Mallet et al., (2007), na cidade de Lavras, MG, que já alertavam sobre os altos índices de coliformes no tofu comercializado naquela cidade. Ashenafi (1994) na cidade de Munique, Alemanha, também

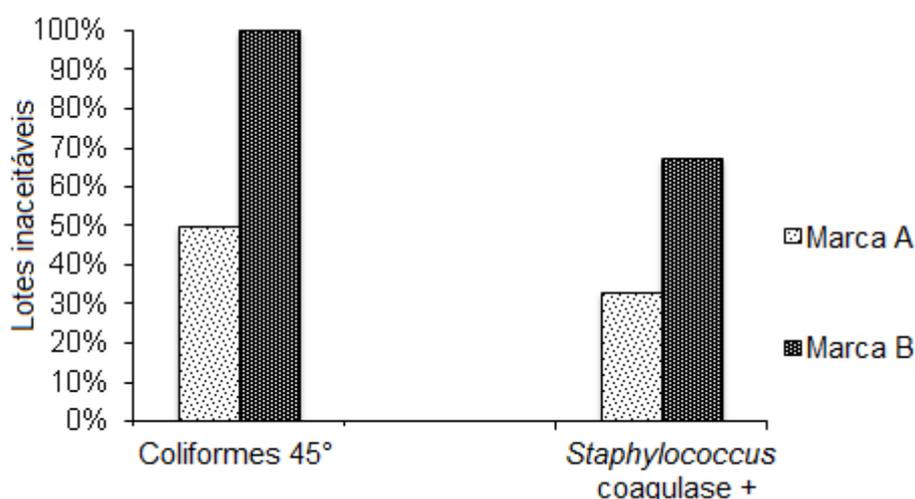
encontrou contagens elevadas de coliformes em queijo tofu fresco com e sem condimentos.

5.4 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo e negativo:

As amostras analisadas apresentaram 33% na marca A e 67% na marca B contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo acima do preconizado pela legislação, conforme tabela 3 e 4 e gráfico 3 (contagens de UFC/mL superiores a 10^2). Os resultados das médias de contagens bacteriológicas das amostras do queijo tofu estão apresentados nos gráficos 1 e 2.

Foi observada que não houve diferença estatística nas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo das empresas A e B, nos diferentes meses de coleta. Isso significa que o nível de contaminação foi constante ao longo do período analisado.

Gráfico 3: Análise qualitativa da presença de Coliformes a 45°C e *Staphylococcus* coagulase positivo no queijo Tofu baseada nos limites estabelecidos pela RDC 12/2001 da Anvisa



Todas as UFC confirmadas como *Staphylococcus* coagulase positivo apresentaram resultados positivos para: coloração de Gram, teste da catalase, teste

da coagulase em tubo, Oxidação e Fermentação da glicose, fermentação do manitol e teste de termonuclease.

A contaminação por esta bactéria é um indicador bastante significativo de manipulação inadequada deste produto. O *Staphylococcus* sp. pode ser encontrado na microbiota dos manipuladores e se não é feita a devida higienização nas mãos pode ocorrer a contaminação do alimento (SOARES et al. 2012). Fatores como higienização e sanitização dos equipamentos, superfícies e mãos são fundamentais para um produção de alimentos de boa qualidade. Caso algum desses locais estejam contaminados podem causar a chamada contaminação cruzada (SNYDER, 1993).

Foi observado que as contagens realizadas de *Staphylococcus* sp. foram de até $5,5 \times 10^4$ UFC/g sendo semelhante a Kooij; Boer (1985) e Mallet (2007). A presença de SCP também foi confirmada em queijo tofu por DANIYAN et al. (2011) embora eles não tenham feito determinação das UFCs. A presença desta bactéria indica que se possui a necessidade de constante controle em relação aos manipuladores de alimentos que devem ser treinados quanto a boas práticas de fabricação e de higiene dos equipamentos dessas indústrias.

Neste estudo também foram encontrados *Staphylococcus* coagulase negativo em altas contagens (Tabelas 3 e 4). Pesquisas como a de Oliveira (1999) e Li e Cheng (1997) afirmam que há produção de toxinas pelos *Staphylococcus* coagulase negativo também. Stamford e colaboradores (2006), por exemplo, isolaram cepas de *Staphylococcus* coagulase negativo de leite de vaca *in natura* e verificaram que eles podem ser produtores de enterotoxinas como o *S. chromogenes* e *S. carnosus*. Lamaita et al. (2005) também observaram que há produção de enterotoxinas em *Staphylococcus* coagulase negativo de amostras de leite cru de algumas propriedades na região Sudeste. CARMO et al. (2002) relatou a ocorrência de surto em mais de 300 indivíduos proveniente do consumo de leite cru contaminado com *Staphylococcus* coagulase negativo. Pode-se então deixar de lado as crenças que o coagulase negativo não são de importância para intoxicações alimentares. Fato interessante é que em todas as amostras que apresentaram contagens acima dos limites de SCP a contagem dos SCN foram sempre superiores à 10^4 UFC/g.

5.5 Contagem e identificação de *Salmonella* sp., *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*

Em todas as amostras analisadas de ambas as empresas não foram encontradas *Salmonella* sp., *B. cereus* e *Listeria* sp. Provavelmente a alta concentração de microrganismos competidores (mesófilos, coliformes e *Staphylococcus* sp.) pode ter dificultado o desenvolvimento e isolamento das mesmas. Alegro; Destro (2007) observou que os coliformes exercem função de inibição de crescimento de *Listeria monocytogenes*. Eles observaram que queijos produzidos com adição de coliformes, estes inibiam o crescimento da *L. monocytogenes* pela produção de ácido láctico em concentração igual ou superior a 0,3%.

O resultado encontrado para *Salmonella* sp. é semelhante ao de Mallet *et al.* (2007) onde eles também relatam ausência desta bactéria, porém encontraram *Bacillus cereus* com até 10^5 UFC/g em amostras analisadas de tofu. Em nenhum estudo foi relatado a detecção de *L. monocytogenes* em tofu o que seria bastante preocupante diante dos malefícios que a mesma pode causar em diversos grupos de pessoas. Outro fato relevante para a ausência de *Salmonella* sp. pode ter sido devido a utilização de caldo lactosado na fase primária de análise, podendo ter acidificado o meio e levando ao não crescimento da bactéria.

A investigação de surtos alimentares no Brasil é bastante falha e com isso não se tem dados sobre a maioria dos alimentos que são fonte de contaminação. Sobre o queijo tofu, por exemplo, não há nenhum surto registrado. O consumo do tofu vem aumentando, porém não existe dados sobre o consumo ou produção. Uma explicação para esta ausência de notificações, apesar das altas contagens de mesófilos, coliformes e *Staphylococcus* coagulase positivos pode estar relacionada ao fato de o tofu ser um alimento que possui um público ainda restrito, o que diminui a casualidade de ingestão / pessoas mais susceptíveis. Também, o fato de haver a possibilidade de cozimento do queijo antes da ingestão, diminui também o número de microrganismos passíveis de causar transtornos. Estas investigações são de responsabilidade dos técnicos nas áreas de vigilância epidemiológica, sanitária, ambiental e do laboratório do órgão municipal de saúde pública. Porém há uma enorme dificuldade de se contabilizar esses dados devido a não notificação por parte

dos consumidores (BRASIL, 2001b). Muitas vezes o consumidor não sabe a que alimento associar o mal estar e devido, também, ao fato de os sintomas não durarem muito tempo ele não procura ajuda médica, o que diminui as chances de notificação.

Perdas de produção, falta ao trabalho, mal estar, doenças, entre outros fatores são problemas que podem ser causados pelas doenças transmitidas por alimentos e que devem ser valorizados pela população, para que se tomem as devidas providências em relação aos estabelecimentos. Estes problemas de saúde pública acometem países desenvolvidos ou não, podem se manifestar desde indisposições com rápida duração até situações onde há necessidade de cuidados hospitalares ou causando até a morte (MARCHI et al., 2011).

Frank e colaboradores (2011) descreveram casos de surtos de origem em diversos alimentos na Alemanha com *Escherichia coli* durante 3 meses. Foram relatados 3816 casos com 54 sendo fatais. Mustafa et al. (2009) relatou mais um caso de intoxicação dessa vez por *Staphylococcus* coagulase positivo em um molho à base de iogurte que foi servido a militares, e que foi manipulado e estocado de maneira inadequada. Isso mostra a importância que se tem de investigar os casos.

No período de 2002 a 2012 foram realizados 52 registros de surto em Bento Gonçalves, RS e 22 alimentos foram associados a esse surto, como: água, canelone de frango, carne de gado, chantilly, croquete, espaguete com molho, carne de frango, maionese, massas, pastel de pizza, polenta com molho, purê de batata com carne, queijos, sanduíche, suco, estrogonofe, talharim com molho branco, torta doce, torta mexicana (com massa de panqueca) e carne. A investigação relatou que houveram diversos microrganismos envolvidos nestes surtos, entre eles estão a *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positivo (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2012).

No Brasil os estados onde mais existiu notificações de casos de surtos alimentares no período de 1999 a 2007 são o Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. O Rio Grande do Sul aparece com 1551 surtos em 1º lugar. Os alimentos mais frequentemente envolvidos nesses surtos foram ovos, mistos, carnes, sobremesas, água e leite e derivados. O *Staphylococcus* sp. aparece em 3º lugar como agente etiológico dos surtos de DTAs. Esses surtos têm diversas consequências como internações, custos para o governo e consumidor, chegando até ao óbito. Nesse período no Brasil foram geradas mais de 90.000 internações, 46

milhões de Reais com gastos com internações e 1580 óbitos foram registrado(BRASIL, 2008).

Portanto, a importância de poder comer um alimento seguro e de boa qualidade tem que ser um direito garantido do consumidor. Os consumidores devem cada vez mais notificar se houver algum caso de DTAs, mesmo que os sintomas não sejam tão graves, pois dessa maneira irão acontecer mais investigações e preocupação por parte do produtor. É dever de todo cidadão comunicar a ocorrência de surto à autoridade sanitária. Profissionais da saúde e responsáveis por organizações, estabelecimentos particulares e públicos de saúde são obrigados a realizarem essa notificação (BRASIL, 2008).

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foi avaliada a presença de diversos microrganismos indicadores de qualidade no queijo Tofu e foi identificado que vários lotes não atenderam ao padrão microbiológico exigido pela legislação brasileira.

A presença de bactérias mesófilas foi de até 10^6 UFC/g em média e, apesar de não haver legislação sobre sua quantificação fica claro, pelos relatos de outros autores e comparações com outros alimentos, que este valor é alto.

Das amostras do queijo tofu analisado, 50% amostras da marca A e 100% da marca B estavam com contagem de coliformes a 45° C acima do permitido.

Quanto à presença de *Staphylococcus* coagulase positivo, 33% dos lotes da marca A e 67% da marca B não atenderam ao padrão de qualidade.

De uma visão geral, ambas as empresas produtoras de queijo tofu apresentaram inconformidade nas contagens de coliformes a 45° C e *Staphylococcus* coagulase positivo.

Quatro lotes da marca A e todos os lotes da marca B estavam impróprios para consumo devido a presença de *E. coli* e/ *Staphylococcus* coagulase positivos.

B. cereus, *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. não foram encontrados em nenhum dos lotes analisados.

7. REFERÊNCIAS

- ALEGRO, LCA; DESTRO, MT. 2007. **Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal.** Tese [Doutorado em Bromatologia] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo.
- ASHENAFI, M. 1994. Microbiological evaluation of tofu and tempeh during processing and storage. *Plant Foods for Human Nutrition*, 45(2):83-189.
- AURELI, P, FERRINE, AM, MANNONI, V, HODZIC, S, WEDELL-WEERGAARD, C, OLIVA, B. 2003. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *International Journal Food Microbiology*. 83(3):325-330.
- BARANCELLI, GV; SILVA-CRUZ, JV; PORTO, E; OLIVEIRA, CAF. 2011. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. *Arquivos Instituto Biológico, São Paulo*, 78(1):155-168,
- BEHRENS, JH; SILVA, MAAP. Atitude do consumidor em relação a soja e produtos derivados. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(3):431-439, 2004.
- BENEDETTI, ACEP; FALCÃO, D. P. 2003. Monitoramento da qualidade higiênico-sanitária no processamento do “leite”de soja na unisoja, Araraquara, SP. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 23(supl):200-205.
- BERK, Z. 1992. Technology of production of edible flours and protein products from soybeans., **FAO Agricultural Services Bulletin** , N. 97, CHAPTER 9 TOFU, TEMPEH, SOYSAUCE AND MIS. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e10.htm#9.1>>. Acesso em: 30 set. 2015.
- BRASIL.2001a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 12, de 2 de janeiro de 2001, aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 janeiro de 2001. Seção1, p. 45 - 53. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/anvisaegis/resol/12_78.pdf>. Acesso em 15 maio 2014.

- BRASIL. 2001b. Ministério da Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica, Alimentar e Sexual. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília, DF. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf> . Acesso em: 15 de setembro de 2015.
- BRASIL. 2002. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde (FUNASA). **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde; 2002. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/guia_vig_epi_vol_1.pdf> Acesso em: 30 de setembro de 2015.
- BRASIL. 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa n.16, de 23 de agosto de 2005. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=12792>> Acesso em: 05 de janeiro de 2015.
- BRENNER, DJ.; FARMER, JJ. "Enterobacteriales". In BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Org.). 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria**. 2. ed. New York: Springer. 849p.
- CAI, T; CHANG, KC. 1999. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47(2):720-727.
- CARMO, LS; DIAS, RS; LINARDI, VR; SENA, MJ; SANTOS, DA; FARIA, ME; PENA, EC; JETT, M; HENEINE, LG. 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food microbiology*, 19(1)9-14.
- CHEN, CH; DING, HC; CHANG, TC. 2001. Rapid identification of *Bacillus cereus* based on the detection of a 28,5 Kilodalton cell surface antigen. *Journal of Food Protection*. 64(3):348-354.
- CONAB. 2013. Soja-Análise da Conjuntura Agropecuária Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/soja__2013_14.pdf>. Acesso em: 05 de janeiro de 2015.
- CORTEZ, ALL. 2003. **Indicadores de qualidade higiênico-sanitária em linguiça frescal comercializada no Município de Jaboticabal-SP**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de

Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

- COSENTINO, S; MULARGIA, AF; PISANO, B. TUVERRI, P; PALMAS, F. 1997. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 38(2-3):235-238.
- COSTALUNGA, S; TONDO, EC. 2002. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo. 33(4):342-346.
- DANIYAN, SY. 2011. Microbiological and Physiochemical Assessment of Street Vended Soybean Cheese Sold in Minna, Nigeria. *International Journal of Biomedical and Advance Research*. 2(1):25-31.
- DEDANI, R, MIGUEL, DP; CHAVES, IR; JUNG, EB; OLIVEIRA, PF; GUAGLIANONID.G; ROSSI, E.A. 2007. Consumo de soja e seus derivados na cidade de Araraquara-SP: Um estudo de caso. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara. 18(1):27-34.
- DUFRENNE, J; SOENTORO, P; TATINE, S; DAY, T.; NOTERMANS, S. 1994. Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *International Journal of Food Microbiology*. 23:99-109.
- FAO/WHO - World Health Organization/Food and Agriculture Organization. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. Microbiological risk assessment series**. 2004:(5). Disponível em: <<http://www.fao.org/es/esn>>. Acesso em: 12 set. 2015.
- FARBER, JM; PETERKIN, P. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**. 55(3):476-511.
- FONTÁN, MCG. 2001. Microbiological changes in “San Simón” cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. *Food Microbiology*, Londres. 18(1):25-33.
- FRANCO, G. 2008. **Tabela de composição química dos alimentos**. 307p.
- FRANCO, BDGM; LANDGRAF, M. 1996. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu. 182p.
- FORSYTHE, SJ. 2013. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*. Ed. Artmed. 607p.
- FOSCHINO, R; GALLI, A; OTTOGALLI, G. 1990. Research on the microflora of UHT milk. *Annals of Microbiology*. 40(1):47-59.

- FRANK, C; WERBER, D; CRAMER, JP.; ASKAR, M; FABER, M; HEIDEN, M; BERNARD, H; FRUTH, A; PRAGER, R; SPODE, A; WADL, M; ZOUFALY, A; JORDAN, S; KEMPER, MJ; FOLLIN, P; MULLER, L; KING, LA; ROSNER, B; BUCHHOLZ, U; STARK, K; KRAUSE, G. 2011. Epidemic Profile of Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. The New England Journal of Medicine online. 365(19):1771-1780.
- GERMANO, PML. 1993. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. Higiene Alimentar. 7(27):6-11.
- GRANUM, PE; LUND, T. 1997. MiniReview. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiology. 157(1997):223-228.
- HITICHINS, AD. 2003. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: U S Food and Drug administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual Online. 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-10.html>>, acesso em: 20/02/2015.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 1984. **Microorganismos de los alimentos: técnicas de análisis microbiológico**. Zaragoza: Acribia, 431p.
- JAY, JM. 2005. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 712p.
- KRAMER, JM; GILBERT, RJ. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Ch 2 In: Doyle MP (ed) Foodborne Bacterial Pathogens, 21-70. New York.
- KOOIJ, JAV; BOER, ED. 1985. A survey of the microbiological quality of commercial tofu in the Netherlands. **Food Microbiology**. 50(2):92-94.
- LAMAITA, HC; CERQUEIRA, MMMOP; CARMO, LS; SANTOS, DA; PENNA, CFAM; SOUZA, MR. 2005. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina de síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária de Zootecnia. 57(5)702-709.
- LI, FC; CHENG, CC.1997. Growth and enterotoxins production by coagulase-negative *Staphylococcus* strains. *Staphylococcus warneri* CCRC 12929 and *S.haemolyticus* CCRC 12923 in cow milk and goat milk. Food-Science. 24(1)120-128.
- LPSN, 2015a. *Staphylococcus* sp. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/staphylococcus.html>>. Data de acesso: 05 jan.

- 2015.
- LPSN, 2015b. *Listeria* sp. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponível em: < <http://www.bacterio.net/listeria.html>>. Data de acesso: 05 jan. 2015.
- MACFADDIN, JF. 2000. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 912p.
- MAIESKI, LM. 2011. **Os principais microrganismos patogênicos que afetam a qualidade do leite**. TCC (Especialização em produção, tecnologia e higiene de alimentos de origem animal) – UFRGS, Porto Alegre.
- MALLET, ACT; SILVA, BC; CIABOTTI, S; BARCELOS, MFP; PICCOLI, RH. 2007. Estudo da Qualidade Sanitária do queijo de soja “TOFU”. XVI Congresso de Pós Graduação da UFLA. 22-26/10/2007. p.1-6.
- MARCHI, DM; BAGGIO, N; TEO, CRPA; BUSATO, MA. 2011. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. 20(3):401-407.
- MELLO, JF. 2012. **Avaliação Higiênico-Sanitária de Unidades de Alimentação e Nutrição e Análise Genotípica dos *Staphylococcus* sp.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do meio Ambiente) – UFRGS - ICBS, Porto Alegre.
- BRASIL, 2008. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2008. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Porto Alegre.
- BRASIL. 2014. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Surtos alimentares no Brasil – dados atualizados em 2014. Disponível em: < <http://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2014/>>. Acesso em: 21 jan. 2016.
- MONTANHINI, MTM; PINTO, JPA; BERSOT, LS. 2012. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite comercializado nos estados do Paraná, Santa Catarina e São Paulo. *Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 14(3):155–158.
- MONTVILLE, TJ; MATTHEWS, K. R. 2008. **Food Microbiology an Introduction**. Washington, DC: ASM, 428 p.
- MURRAY, PR. 1999. **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed. Washington, DC: Ellen Jo Baron. 1.773p.

- MUSTAFA, MMS; JAIN, LCS; AGRAWAL, CVK. 2009. Food Poisoning Outbreak in a Military Establishment. MJAFI online. 65(3)240-243.
- NERO, LA. **Listeria monocytogenes e Salmonella spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.** [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo (USP); 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso em: 10 de setembro/2015.
- OLIVEIRA, AM. 1999. **Investigação do comportamento de estafilococos enterotoxigênicos coagulase negativos, em alimentos.** (Tese de Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- PAULLETO, FB; FOGAÇA, AO. 2012. Avaliação da composição centesimal de tofu e okara. Ciências da Saúde. 13(1): p.85-95.
- PEREIRA, ML; CARMO, LS; PEREIRA, JL. 2001. Comportamento de estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas, em alimentos experimentalmente inoculados. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 21(2)171-175.
- PHLS. 2000. Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sample at the point of sale. PHLS Advisory Committee for Food and Dairy Products. Communicable disease and public health / PHLS. 3:163-167.
- RADDI, MSG; LEITE, CQF; MENDONÇA, CP. 1988. *Staphylococcus aureus*: Portadores entre manipuladores de alimentos. Revista de Saúde Pública. 22(1)36-40.
- REKHA, CG. 2010. **Soybased Functional Foods with Reference to Probiotics and Isoflavones.** [tese] Mysore, India. Department food microbiology, Central Food Technological Research.
- ROBINSON, RK; PHILL, MAD. 1987. Microbiologia lactológica. Zaragoza: Acribia. p. 18-32.
- RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Municipal de saúde. **Relatório epidemiológico.** Bento Gonçalves, RS. 2012. Disponível em: <<http://www.bentogoncalves.rs.gov.br/downloads/Saude/Epidemiologia/Intoxicacoes/SMS-Intoxicacoes-Alimentares-1998-2012.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2016.
- ROCOUR, J. 1996. Risk factors for listeriosis. Food Control. 7(4-5):195-202.

- RYSER, ET. ; DONNELLY, CW. *Listeria*. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, DF. 2001. **Compendium of methods the microbiological examination of foods**. Washington: Edward Brothers. 353p.
- SANTOS, LR; NASCIMENTO, VP; FLORES, ML. 2002. *Salmonella enteritidis* isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no estado do Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar*. 6(102-103):93-99.
- SANTOS, LS; SANTOS, DO; FREITAS, CC; FERREIRA, BLA; AFONSO, IF; RODRIGUES, CR; CASTRO, HC. 2007. *Staphylococcus aureus* visitando uma cepa hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial*. 43(6).
- SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. 2012. Disponível em: <<http://www.bentogoncalves.rs.gov.br/downloads/Saude/Epidemiologia/Intoxicacoes/SMS-Intoxicacoes-Alimentares-1998-2012.pdf>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2016.
- SIIVA, N; JUNQUEIRA, VCA; SILVEIRA. NFA; TANIWAKI, MH; SANTOS, RFS; GOMES, RAR. 2007. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela. 317p.
- SNYDER, POJ. 1993. **Developing a total quality management based food safety program for a chilled food system**. [s.l.]: Cleveland Range and Hospitality Institute of Technology Management.
- SOARES, LS; ALMEIDA, RCC; CERQUEIRA, ES; CARVALHO, JS; NUNES, IL. 2012. Knowledge, attitudes and practices in food safety and the presence of coagulase- positive staphylococci on hands of food handlers in the schools of Camaçari, Brazil. *Food Control*. 27(1):206-213.
- SOUZA, CP. 2006. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: Utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. *Revista APS*. 9(1)83-88.
- STAMFORD, TLM; SILA, CGM; MOTA, RA; NETO, AC. 2006. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite *in natura*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26(1)41-45.
- TOFU STANDARDS. VOLUNTARY STANDARDS FOR THE COMPOSITION AND LABELING OF SOYMILK IN THE UNITED STATES. 1996. 15p.

- Disponível em: < <http://www.soyfoods.org/wp-content/uploads/2006/11/smstandards.pdf>>. Acesso em: 05 jan. 2015.
- UHITIL, S; JAKSIC, S; PETRAK, T; MEDIC, H; KAROLYI, LG. 2004. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. *Food Control*. 15(3):213-216.
- USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>&<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>>. Acesso em 30 agost. 2015.
- VAN KOOJI, JA, DE BOER, E. 1985. A survey of the microbiological quality of commercial tofu in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*. 2(6):349–354.
- WANG, HL. Uses of soybeans as foods in the west with emphasis on tofu and tempeh. American Chemical Society. *Plant Proteins, Biological effects and Chemistry*, ACS Symposium series. 312:45-60. 1986. Disponível em: <<http://naldc.nal.usda.gov/download/24012/PDF>>. Acesso em: 10/10/2015.
- ZAFFARI, CB; MELLO, JF; COSTA, M. 2007. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria. 37(3):862-867,
- ZECCONI, A; HAHN, G. 2000. *Staphylococcus aureus* in raw milk and health risk. *Bulletin of International Dairy Federation*. 345:15-18.