



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB  
CURSO DE FARMÁCIA**

**YLKA JANNIELLY BARBALHO DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS MINIMAMENTE  
PROCESSADOS COMERCIALIZADOS EM BRASÍLIA-DF**

**BRASÍLIA, DF  
2016**

YLKA JANNIELLY BARBALHO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS MINIMAMENTE  
PROCESSADOS COMERCIALIZADOS EM BRASÍLIA-DF**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

**Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi**

**Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva**

BRASÍLIA, DF  
2016

YLKA JANNIELLY BARBALHO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS MINIMAMENTE  
PROCESSADOS COMERCIALIZADOS EM BRASÍLIA-DF**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva  
(FCE/ Universidade de Brasília)

---

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire  
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF  
2016

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, pela graça de poder estar vivendo esse momento, por todos os dias felizes, de conquistas, aprendizagem, e também aqueles dias tristes, quantas vezes tive vontade de desistir, mas ele estava lá comigo nessa caminhada dando força para atravessar cada obstáculo. Obrigada meu Deus!

Aos meus pais, que foram e são fundamentais na minha formação como pessoa, obrigada por estarem sempre me apoiando em todas as minhas decisões e confiarem em mim. Todos esses anos distantes foram doloridos, mas essenciais para eu criar força e lembrar que tudo isso é por vocês.

Aos meus irmãos Sidney e Rodrigo, que sempre torceram e acreditaram em mim. Obrigada pelo amor e carinho de sempre.

A todos os meus familiares que participaram direta ou indiretamente dessa minha jornada, principalmente aos que me acolheram em Brasília, Titita Eugênia, Nolinha e Tia Karol, pelo carinho e por acreditarem em mim. A Titita Aninha, que esteve comigo em todas as horas de alegria e tristeza, mesmo tão distante.

Ao meu namorado Bruno, que sempre me deu força, carinho e amor em todos os momentos. Com você a caminhada se torna mais leve.

As minhas orientadoras Daniela e Izabel, por todos os ensinamentos e paciência.

Por fim, a todos os amigos que estiveram junto comigo, alguns desde a infância, na torcida, outros conquistados durante a faculdade, estando mais próximos nas horas de perrengue e alegrias. Obrigada a todos!

## RESUMO

Neste trabalho, foram realizadas as análises microbiológicas de treze amostras de oito marcas diferentes de vegetais minimamente processados comercializados em seis diferentes supermercados de Brasília-DF. Os resultados mostraram que seis amostras (46,2%) de vegetais minimamente processados estavam impróprias para o consumo. Essas amostras apresentaram valores de coliformes termotolerantes superior ao limite estabelecido pela legislação brasileira para vegetais frescos que é de  $1,0 \times 10^2$  NMP/g. Na contagem de bactérias mesófilas, seis amostras 42,6% dos vegetais minimamente processados apresentaram valores de bactérias mesófilas acima do esperado para os vegetais sanitizados (acima de  $10^6$  UFC/g, variando de  $2,6 \times 10^6$  a  $4,2 \times 10^7$  UFC/g). As contagens de bactérias psicrotróficas foram elevadas em oito amostras analisadas (61,5%), encontrando-se acima de  $10^6$  UFC/g, variando de  $1,5 \times 10^6$  a  $7,3 \times 10^7$  UFC/g. Nas análises moleculares, oito amostras (61,5%) tiveram cepas de *E. coli* confirmadas por PCR. As amostras 1, 2, 3 e 4 apesar de apresentarem cepas de *E. coli*, estavam dentro dos limites aceitáveis de coliformes termotolerantes estabelecidos pela legislação. Já as amostras 5, 6, 7 e 9 estavam impróprias para o consumo. Após as análises, cinco amostras (38,4%) apresentaram cepas de *S. aureus*. Apesar do número aceitável de bactérias *S. aureus* em três amostras, a presença dessa bactéria mostrou condições higiênicas insatisfatórias por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana. As amostras de couve 5 e 9 que já haviam sido reprovadas pelo excesso de coliformes termotolerantes, apresentaram contagens de *S. aureus* acima do permitido pela legislação brasileira e seu consumo representaria risco à saúde do consumidor, pois a região gênica *EntC* identificada nessas bactérias indicou que essas cepas eram produtoras de enterotoxinas.

**Palavras chave:** vegetais minimamente processados, segurança microbiológica, doenças transmitidas por alimentos, análises moleculares.

## ABSTRACT

In this work, it was performed the microbiological analyzes of 13 samples of 8 different brands of minimally processed vegetables marketed in 6 different supermarkets in Brasilia, DF. The results showed that 6 samples (46.2%) of minimally processed vegetables were unfit for consumption. These samples showed thermotolerant coliforms values higher than the limit established by Brazilian law for fresh vegetables is  $1,0 \times 10^2$  NMP/g. In counting of mesophilic bacteria, 6 samples or 42.6% of minimally processed vegetables showed values of mesophilic bacteria higher than expected for the sanitized vegetables (over  $10^6$  CFU/g, ranging from  $2,6 \times 10^6$  to  $4,2 \times 10^7$  CFU/g). Psychotropic bacteria counts were elevated in 8 samples analyzed (61.5%), lying above  $10^6$  CFU/g, ranging from  $1,5 \times 10^6$  to  $7,3 \times 10^7$  CFU/g. In the molecular analysis, 8 samples (61.5%) had *E. coli* strains confirmed by PCR. Samples 1, 2, 3, 4, despite having *E. coli* strains, were within the acceptable limits established by the legislation for thermotolerant coliforms. However the samples 5, 6, 7 and 9 were unfit for consumption. After analysis, five samples (38.4%) presented *S. aureus* strains. Despite the acceptable number of *S. aureus* bacteria in three samples, the presence of this bacterium showed unsatisfactory hygienic conditions because it is a coming bacterium of human manipulation. Samples of kale 5 and 9 that already had been reprovved by excess thermotolerant coliforms showed *S. aureus* counts above permitted by Brazilian law and its consumption is a risk to consumer health because EntC gene region identified in these bacteria indicated that these strains were enterotoxin producers.

**Key words:** minimally processed vegetables, microbiological safety, foodborne diseases, molecular analyses.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1 Produtos minimamente processados .....	9
1.2 Consumo de vegetais minimamente processados .....	10
1.3 Produção e qualidade microbiológica dos produtos minimamente processados .....	10
1.4 Contaminação microbiológica dos produtos minimamente processados .....	12
1.5 Surto de doenças transmitidas por alimentos .....	13
1.6 Legislação brasileira e os produtos minimamente processados .....	14
1.7 Biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos .....	15
2. OBJETIVOS .....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos .....	17
3. JUSTIFICATIVA .....	18
4. METODOLOGIA .....	19
4.1 Coleta e preparo das amostras .....	19
4.2 Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas .....	20
4.3 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes .....	20
4.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	22
4.5 Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. ....	23
4.6 Análises moleculares e extração de DNA bacteriano. ....	23
4.7 Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR .....	25
4.8 PCR qualitativo .....	26
4.9 Eletroforese em gel de agarose .....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1 Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas .....	28
5.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes .....	30
5.3 Determinação da presença de <i>Salmonella</i> sp. ....	33
5.4 Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp. ....	33
5.5 Análises moleculares .....	35
5.6 Análise geral .....	38
6. CONCLUSÕES .....	41
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	21
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.....	25
<b>Tabela 3.</b> Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	26
<b>Tabela 4.</b> Reagentes utilizados para realização da reação de PCR.....	27
<b>Tabela 5.</b> Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas amostras de vegetais minimamente processados.....	28
<b>Tabela 6.</b> Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de vegetais minimamente processados.....	31
<b>Tabela 7.</b> Contagem das colônias no <i>Staphylococcus</i> sp. (colônias fermentadoras de manitol e após coloração de gram), nas amostras de vegetais minimamente processados.....	34
<b>Tabela 8.</b> Identificação por meio de PCR de bactérias <i>Escherichia coli</i> isoladas das amostras de vegetais minimamente processados.....	35
<b>Tabela 9.</b> Identificação por meio de PCR de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas das amostras de vegetais minimamente pro	37
<b>Tabela 10.</b> Classificação e detalhamento de amostras de vegetais minimamente processados aprovadas, satisfatórias e reprovadas para consumo humano cessados.....	39



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI.....	23
<b>Figura 2.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene EutC de <i>E. coli</i> .....	36
<b>Figura 3.</b> Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene entC de <i>S. aureus</i> . ....	38

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Quantidade de amostras positivas para cada bactéria pesquisada.....	40
---	----

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Genoma completo de <i>E. coli</i> .....	48
<b>Anexo 2.</b> Sequência de Primer para <i>E. coli</i> .....	50
<b>Anexo 3.</b> Genoma completo de <i>S. aureus</i> precursor de enteroxina C3.....	51
<b>Anexo 4.</b> Sequência de Primer para <i>S. aureus</i> .....	52

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Produtos minimamente processados**

Os produtos minimamente processados (PMP) são também conhecidos como levemente processados, pré-preparados, pré-cortados e parcialmente processados (EMBRAPA, 2011). Segundo o International Fresh-Cut Produce Association (IFPA, 2001), os PMP são frutas ou hortaliças alteradas fisicamente, a partir de sua forma original, mantendo seu aspecto fresco. O processamento provoca alterações físicas e fisiológicas que afetam a viabilidade e a qualidade do produto, os quais se deterioram mais rapidamente do que o produto intacto (EMBRAPA, 2007). Os PMP devem ter mantidas as qualidades nutritivas e sensoriais, de forma que não sejam utilizados conservantes químicos e devem ser seguros na perspectiva sanitária (PINTO, 2007).

O estímulo para que se tenha uma vida saudável nos tempos atuais vem aumentando a procura por vegetais frescos. Considerando o estilo de vida moderno da população, ocorre também uma maior procura por produtos prontos para o consumo, de acesso fácil e de qualidade. Com isso, o processamento mínimo de vegetais está em expansão e esse tipo de alimento está cada vez mais presente no dia a dia da população (EMBRAPA, 2007). Uma grande vantagem dos PMP é que são comercializados prontos para o consumo, ou seja, lavados, descascados, cortados e empacotados (SILVA, 2006).

Com a atuação ativa da mulher no mercado de trabalho, o tempo dedicado para o preparo de alimentos no dia a dia em casa está menor, o que leva ao aumento na aquisição de produtos semi-prontos como os PMP, influenciando o avanço no uso de novas tecnologias na indústria de alimentos e o aumento da variabilidade destes produtos no mercado. O maior poder aquisitivo das famílias nos últimos anos aumenta o consumo e também a exigência na qualidade desses produtos (PINTO, 2007).

Além da praticidade dos alimentos minimamente processados e da percepção de que os produtos frescos são mais saudáveis que os enlatados, o fato deles serem fornecidos nas quantidades ideais para o consumidor estimula o aumento do consumo (PINTO, 2007).

## **1.2 Consumo de vegetais minimamente processados**

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o baixo consumo de frutas e vegetais está entre os principais fatores relacionados à maior incidência de certas doenças na população humana. Frutas e vegetais são de grande importância para uma dieta saudável por apresentarem baixo valor calórico e serem ricos em fibras alimentares, vitaminas, minerais, entre outros elementos fundamentais para o organismo (PINTO, 2007).

O consumo de frutas, hortaliças e grãos pode prevenir e diminuir o risco de certos tipos de câncer e outras doenças crônicas, já que suas vitaminas (conhecidas como antioxidantes) combatem os radicais livres, que contribuem para o surgimento dessas doenças. Apesar dos benefícios, o consumo de frutas e hortaliças pelos brasileiros ainda é inferior ao recomendado pela OMS, que é de 400 g por dia (PINTO, 2007; EMBRAPA, 2007).

De acordo com a Associação Brasileira de Horticultura (2005), o comércio dos PMP cresce de 10 a 12% ao ano. A comercialização destes produtos está mais concentrada em médios e grandes centros urbanos, como na cidade de São Paulo, onde 92% dos supermercados fornecem PMP (EMBRAPA, 2007).

No ano de 2004, no Distrito Federal os consumidores tiveram preferência de 29% por hortaliças minimamente processadas. Estudos relatam que o DF produz e distribui comercialmente nos supermercados da cidade e entorno por ano, uma média de 200 toneladas de frutas e hortaliças minimamente processadas (BARBOSA, 2014).

## **1.3 Produção e qualidade microbiológica dos produtos minimamente processados**

As etapas do processamento mínimo de frutas ou vegetais incluem seleção, lavagem, classificação, corte, sanitização, centrifugação, embalagem e refrigeração de forma a se obter um produto comestível, fresco e que não necessite de outros preparos (TRESSELER et al., 2009). No processo de lavagem são retiradas as matérias estranhas, como terra, inseto, entre outras impurezas. No corte ocorre à

retirada de partes que não são úteis para o consumo, como a casca e sementes e os produtos são fatiados, picados ou ralados (PINTO, 2007; EMBRAPA, 2007).

Na sanitização o cloro é utilizado como sanificante para a eliminação de grande parte de microrganismos e após sanitização os produtos são centrifugados para remoção da água de lavagem. Os PMP são embalados imediatamente de forma adequada para cada tipo de produto, com intuito de proteger contra danos e contaminações externas. Por último vem à temperatura de armazenamento, que é essencial para o controle de crescimento dos microrganismos e que pode afetar diretamente na velocidade de multiplicação desses microrganismos (PINTO, 2007; EMBRAPA, 2007).

Para o controle microbiológico dos PMP é essencial que se respeite a temperatura de refrigeração (5°C), pois há um controle do processo metabólico dos vegetais e conseqüentemente um aumento na vida de prateleira do produto, além da diminuição do desenvolvimento de microrganismos deterioradores e patogênicos, evitando danos à saúde humana (EMBRAPA, 2007). Porém, essa temperatura ideal de armazenamento muitas vezes não é respeitada, como confirmado no estudo realizado por Nascimento et al. (2003) em supermercados e hipermercados no Distrito Federal, onde verificou-se que as temperaturas de oito equipamentos estavam acima de 10°C, o dobro da temperatura de armazenamento recomendada para os PMP em geral.

Geralmente nas embalagens dos PMP são utilizados sistemas com atmosfera modificada, onde o crescimento microbiano é afetado pelas concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. O número e tipo de microrganismos, os nutrientes e a temperatura podem influenciar na capacidade de um microrganismo sobreviver e crescer em produtos minimamente processados nesse tipo de embalagem (IFPA, 2001). *Listeria monocytogenes* é um dos patógenos que pode se desenvolver bem nesse tipo de sistema de atmosfera modificada (EMBRAPA, 2007).

Os produtos minimamente processados são mais perecíveis dos que os produtos in natura, devido à exposição dos tecidos internos, o que leva a uma aceleração do metabolismo gerando um aumento da taxa respiratória e conseqüentemente a uma deterioração mais rápida (PINTO, 2007; ROCHA, 2014). No processamento, ao cortar as hortaliças são liberados fluidos celulares ricos em nutrientes, possibilitando o aumento da carga microbiana inicial (SILVA, 2006). Com isso fica evidente que a preparação desses vegetais deve ser regulada pelas boas

práticas de fabricação (BPF) e que também sejam utilizadas ferramentas como Boas Práticas Agrícolas (BPA) e Análise de Perigos e Pontos críticos de Controle (APPCC), visando à qualidade da produção (FDA, 2001; EMBRAPA, 2007).

#### **1.4 Contaminação microbiológica dos produtos minimamente processados**

Os vegetais contêm uma microbiota inicial intrínseca que é proveniente do solo, água e ar. O aumento dessa microbiota vai depender da forma de cultivo transporte, armazenamento e processamento. As alterações microbiológicas de hortaliças podem estar relacionadas com fatores intrínsecos como quantidade de água e acidez e fatores extrínsecos como manipulação, temperatura e atmosfera de armazenamento (ROCHA, 2014). Geralmente a contaminação com microrganismos patogênicos ocorre por causa de má higiene (SILVA, 2006; PINTO, 2007).

As condições microbiológicas são importantes na qualidade dos vegetais minimamente processados porque estes estão susceptíveis a contaminação que pode ocorrer em qualquer etapa do processo produtivo. Por isso, a segurança dos produtos frescos deve abranger toda a cadeia do processo produtivo, desde as etapas preliminares até as fases finais do processamento (SANTOS, 2008; SILVA, 2006).

Muitos microrganismos podem afetar a qualidade e segurança desses produtos, inclusive microrganismos patogênicos, que normalmente não estariam presentes e podem passar a fazer parte da microbiota, sendo eles relacionados principalmente com o manuseio a que são submetidos os PMP no momento do preparo (TRESSELER, et al., 2009).

Alguns microrganismos são resistentes à temperatura de refrigeração como as bactérias psicrotróficas que sobrevivem em temperaturas baixas. As bactérias psicrotróficas que se destacam são *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophila* (PINTO, 2007). Muitos microrganismos mesófilos apresentam uma alta taxa de crescimento a temperaturas de 12°C, quando ocorre abuso da cadeia do frio, levando a uma rápida deterioração dos PMP (ROCHA, 2014).

Os microrganismos mais comuns encontrados nos PMP são bactérias, fungos e leveduras. Dentre as bactérias patogênicas, destacam-se as do gênero *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* (IFPA, 2001). As seguintes bactérias patogênicas de interesse já foram identificadas em vegetais consumidos crus: *Salmonella spp.*,

*Shigella spp.*, *E. coli*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp.*, *Bacillus cereus*, *Vibrio spp.*, além de vírus e parasitas diversos (GOODBURN e WALLACE, 2013; HANNING e RICKE, 2009; TOURNAS, 2005).

A quantidade microbiana no momento da colheita é maior que  $10^2$  UFC por grama de matéria fresca e é sabido que todos os grupos bacterianos aumentam após o corte no processo de produção, o que contribui para a diminuição da qualidade e do tempo de vida de prateleira dos PMP (ALLENDE et al., 2004; PINTO, 2007; IFPA, 2001). Portanto, a indústria de PMP e os supermercados devem garantir aos consumidores que o produto esteja seguro e sem contaminantes que possam prejudicar a saúde (EMBRAPA, 2007).

### **1.5 Surto de doenças transmitidas por alimentos**

Um surto de doença transmitida por alimento é caracterizado pela ocorrência de dois ou mais casos de uma doença com as mesmas características clínicas, após a ingestão de um mesmo alimento. Para a saúde pública mundial as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são consideradas um grave problema (SANTANA, 2010). As DTAs podem ser causadas através da ingestão de alimentos contaminados por agentes químicos ou biológicos. Estudos relatam que para cada caso de DTA notificado, há aproximadamente 136 casos não notificados na mesma população (AMSON, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* estão frequentemente presentes nos surtos de doenças transmitidas por alimentos em vegetais minimamente processados (DELAQUIS et al., 2007; SODERSTROM et al., 2008). Esses surtos estão geralmente relacionados com as práticas agrícolas inadequadas, como por exemplo, uso de água contaminada ou uso estrume animal sem tratamento anterior (WOOD et al., 2010).

A contaminação por esses patógenos pode se dar em qualquer etapa do processo produtivo, porém a contaminação pré-colheita, segundo alguns autores, é mais preocupante, pois os patógenos podem se internalizar nos tecidos das plantas e se protegerem de sanitizantes utilizados na etapa pós-colheita (COOLEY et al., 2003;

GIL et al., 2009). A legislação brasileira (BRASIL, 2001) considera expressamente proibida a presença de *Salmonella sp.* em alimentos frescos para consumo direto.

O *Staphylococcus aureus* também é um dos agentes bacterianos mais causadores de surtos, porém é sabido que os casos são pouco retratados na literatura pelo fato de os sintomas apresentados serem mais comuns, como diarreia intensa, vômitos e dores abdominais. Apesar de serem pouco notificados, estima-se que esse patógeno está associado a 98% dos casos de surtos causados por intoxicações alimentares. *Staphylococcus aureus* pode produzir enterotoxinas, as quais são estáveis a temperaturas de até 100°C por 30 minutos e ainda podem ser resistentes a enzimas gástricas (BARBOSA, 2014; SANTANA, 2010).

Em um estudo realizado no Distrito Federal em 2014 por Barbosa, com amostras de couves minimamente processadas, foi identificada contaminação por bactérias como *Salmonella entérica*, *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*, indicando que ainda há uma falta de qualidade na produção e conservação destes produtos, que podem causar um sério risco a saúde da população.

## **1.6 Legislação brasileira e os produtos minimamente processados**

Ainda há uma grande dificuldade no controle dos produtos minimamente processados pelo fato de não existir uma legislação específica para estes produtos, podendo agravar o problema de contaminação microbiológica pela falta de regulamentação (PINTO, 2007). Mesmo com o grande crescimento do mercado de minimamente processados, é significativa a quantidade de doenças transmitidas por alimentos relacionadas ao consumo destes produtos, o que deveria chamar mais a atenção de agências regulatórias como a ANVISA e o Instituto de defesa dos direitos dos consumidores (PAULA et al., 2008).

A RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), que estabelece o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos determina os parâmetros microbiológicos para frutas e hortaliças in natura e pode ser utilizada como referência para os PMP. De acordo com a RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, a quantidade limite para coliformes a 45°C é de 10<sup>2</sup> NMP/g e *Salmonella* deve estar ausente em 25g do produto para hortaliças,

legumes e similares, frescas, "*in natura*", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto (BRASIL, 2001).

### **1.7 Biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos**

Em testes para identificação e biotipagem bacteriana na microbiologia é comum o uso de meios de cultura seletivos, complementados com testes bioquímicos, sendo a maior parte deles enzimáticos, juntamente com testes sorológicos (GANDRA et al., 2008).

Tais testes têm como desvantagem o fato de poderem sofrer variações devido a fatores ambientais, risco de interpretações errôneas, baixo poder discriminatório principalmente em microrganismos com baixa variabilidade genética, custo elevado, devido à grande quantidade de determinações microbiológicas, além de ser necessário um maior tempo para obter os resultados (FARBER et al., 2001; MARIN et al., 2006). Com isso tem-se aumentado a utilização de técnicas moleculares para a mesma finalidade e com uma maior eficiência e sensibilidade (BARBOSA, 2014).

As técnicas moleculares genotípicas estão relacionadas com a caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total do microrganismo. As técnicas mais utilizadas na detecção e caracterização de bactérias patogênicas presente em alimentos são as fundamentadas na amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), que é muito sensível, na qual pequenas quantidades de sequências de DNA ou RNA podem ser amplificadas, obtendo milhões de cópias da sequência inicial (GANDRA et al., 2008).

Na PCR, moléculas de DNA são enzimaticamente amplificadas *in vitro*, pela ação de enzimas Taq polimerases e de oligonucleotídeos iniciadores conhecidos como primers, sobre um DNA molde. A PCR realiza-se a partir de uma quantidade mínima de amostra (teoricamente pode ser a partir de 1 molécula de DNA). Nos últimos anos, a PCR foi muito utilizada e se tornou um método conhecido de biologia molecular utilizado em diagnóstico microbiológico (BASTOS, 2008).

Segundo Zaha (2003), com o uso da técnica de amplificação de DNA juntamente com a PCR foi possível melhorar as perspectivas em variadas áreas. Essa técnica apresenta vantagens em relação às técnicas convencionais, como maior



poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (BASTOS,2008).

Zocche e colaboradores (2009) demonstraram que as PCR são eficientes na detecção dos genes de EEA, EEB, EEC e EED de *Staphylococcus aureus* e foi possível observar que a prevalência de *S. aureus* portadores dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* é baixa em alimentos de origem animal, na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil e que a provável origem de *S. aureus* nas amostras avaliadas é através dos manipuladores de alimentos.

Por outro lado, Flôres e colaboradores (2003), observaram que na análise de contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial, o resultado não demonstrou diferença significativa entre a PCR e os testes microbiológicos para a detecção de *Salmonella* em ovos, havendo concordância de diagnóstico entre as metodologias. Todas as amostras positivas na parte microbiológica foram também positivas na PCR.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo realizar as análises microbiológicas em diferentes marcas de vegetais minimamente processados comercializados em Brasília.

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* sp. e pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Atualmente com as mudanças nos hábitos alimentares, vem aumentando o interesse da população por vegetais frescos. E assim, paralelamente, cresceu a oferta de vegetais minimamente processados em mercados e supermercados, com o intuito de oferecer agilidade, qualidade e facilidade para o consumidor. Devido a esse crescimento rápido e considerável na oferta e procura por tais produtos, nem sempre a qualidade destes são adequadas para o consumo humano. Com isso, o presente trabalho avaliou as condições microbiológicas de vegetais minimamente processados disponíveis em variados supermercados de Brasília, com o intuito de determinar se estes produtos apresentam a qualidade mínima para serem distribuídos e comercializados de forma a garantir a segurança alimentar do consumidor.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Coleta e preparo das amostras

Foram coletadas treze amostras de oito marcas diferentes de vegetais minimamente processados comercializados em seis diferentes supermercados de Brasília-DF no período consecutivo de três meses, com início das coletas em agosto e término em novembro de 2015.

As amostras avaliadas foram: 1- salada de alface e cenoura fatiada (marca 1); 2- salada de alface, rúcula, cenoura fatiada e tomate (marca 2); 3- acelga picada (marca 1); 4- broto girassol (marca 3); 5- couve fatiada (marca 1); 6- salada de repolho verde e repolho roxo, ambos fatiados (marca 4); 7- salada de repolho verde, repolho roxo e cenoura, ambos fatiados (marca 5); 8- salada de alface, tomate, milho, queijo e cogumelo (marca 6); 9- couve fatiada (marca 7); 10- salada de radichio (marca 8); 11- salada de alface (marca 2); 12- couve fatiada (marca 2); 13- repolho verde fatiado (marca 2).

As amostras foram coletadas nos supermercados e levadas imediatamente para o laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ceilândia, UnB, não excedendo uma hora entre o período de coleta e o início das análises das mesmas. Todas as amostras encontravam-se em embalagens fechadas, dentro do prazo de validade e foram mantidas sob refrigeração até o início das análises.

Para o preparo das amostras, em condições de assepsia, foram pesadas 25g da amostra em 225 ml de água peptonada 0,1% (p/v) estéril e homogeneizado por 20 minutos, obtendo-se a primeira diluição ( $10^{-1}$ ). A partir desta foram realizadas as demais diluições decimais, seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) até a diluição  $10^{-5}$ .

As análises microbiológicas realizadas foram: contagem total dos microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotóxicos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus sp.* e pesquisa de *Salmonella sp.* e *E. coli.* As análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média e desvio padrão.

## 4.2 Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas

Para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias mesófilas e a 7°C ± 1°C por 7 dias para bactérias psicotróficas. Para a contagem de colônias, selecionaram-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente, e expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

## 4.3 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes

A técnica de Número Mais Provável (NMP) é um método que estima a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra. A determinação do NMP de microrganismos é baseada no princípio de que, numa amostra líquida as bactérias podem ser separadas por agitação, resultando numa suspensão em que as células estejam uniformemente distribuídas. A comparação de tubos com crescimento positivo ou negativo, após a incubação, permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade original dos microrganismos na amostra (FENG et al., 2002).

Para a determinação do NMP de coliformes, inoculou-se 1 ml de cada diluição em uma série de 3 tubos de ensaio contendo caldo lactosado (lactose 0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v) e tubos de Durham invertidos e a incubou-se a 37°C durante 24 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais (FENG et al., 2002).

Alíquotas dos tubos positivos no caldo lactosado foram transferidas, simultaneamente, para caldo verde brilhante bile lactose 2% (para a confirmação de coliformes totais) e para caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e tubos de Durham invertidos foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais. Os tubos contendo caldo *Escherichia coli* e tubos de Durham invertidos foram incubados em banho-maria a

45°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes. Através da Tabela 1 foi obtido o NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por grama da amostra (NMP/g) (FENG et al., 2002).

**Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.**

Tabela para 3 tubos, cada um com inoculo de 0.1, 0.01 e 0.001 ml, os NMPs por grama e os intervalos de confiança a 95%.											
Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

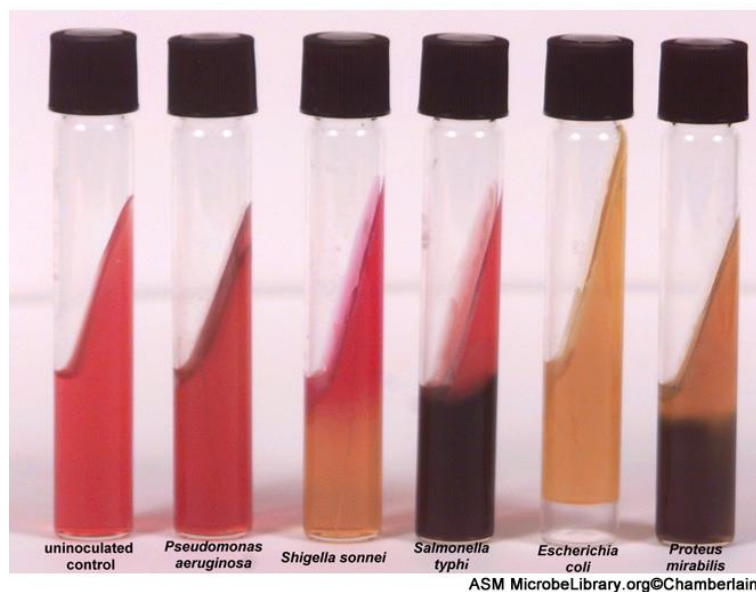
**FONTE:**<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods>

#### 4.4 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* sp., a diluição  $10^{-1}$  das amostras foi incubada à 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação, alíquotas de 1 ml foram transferidas para caldo selenito-cistina e incubadas a 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semeou-se em estrias para isolamento, placas de Petri contendo o meio ágar *Salmonella Shigella* (Ágar SS).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em ágar *Salmonella Shigella* para obtenção de colônias puras e então estas foram transferidas para meio de cultivo contendo ágar TSI (três açúcares e ferro). Este meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose (1%), além do indicador vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos. A fermentação de carboidratos é indicada pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo. Se o microrganismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, dando origem a sulfeto de ferro que, sendo insolúvel, precipita e tem cor negra: indicado pela cor preta na base do tubo (ANVISA, 2010).

No ágar TSI, enterobactérias como *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a glicose e a lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares do meio) tornando a base e a superfície do tubo de cor amarela e geralmente é possível detectar a presença de gás (CO<sub>2</sub>) pela formação de bolhas e/ou fragmentação do meio. Quando a superfície do meio está vermelha e a base amarela significa que ocorreu fermentação apenas da glicose (ficando a lactose e a sacarose sem fermentação). Os microrganismos degradam, preferencialmente, a glicose em primeiro lugar, mas como este substrato está presente em concentração mínima, a quantidade de ácido produzida é limitada e é rapidamente oxidada na superfície. Se houver produção de sulfeto de ferro a base do meio torna-se negra (Figura 1). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de H<sub>2</sub>S como *Salmonella* (ANVISA, 2010). As colônias suspeitas foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.



**Figura 1. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).**

#### **4.5 Contagem de *Staphylococcus sp.***

Para a contagem de *Staphylococcus sp.*, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar PCA suplementado com cloreto de sódio 7,5% (p/v) e incubadas a 37°C por 48 h. Após incubação, as colônias isoladas foram semeadas em ágar Sal Manitol e incubadas em 37°C por 48h. As colônias fermentadoras de manitol foram contadas e posteriormente coradas pelo método de Gram. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

#### **4.6 Análises moleculares e extração de DNA bacteriano.**

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das soluções reagentes (o tampão AW foi colocado em banho-maria à 50°C), materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas das amostras de alimentos e cultivadas por 12 h em caldo LB.

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), com adaptações. Adicionou-se 9,0 mL da amostra (suspensão de células bacterianas em



caldo LB) no tubo cônico tipo falcon de 15 mL, centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm e descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o sedimento). Foram adicionados 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão CF (tampão de lise celular pré-aquecido a 65°C), encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função impedir a formação de grumos celulares). Após isso, os tubos foram homogeneizados em “vortex”, até a completa homogeneização da solução. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 300 µL do tampão C4 (contém isotiocianato de guanidina), 300 µL de etanol 96%, homogeneizou-se e deixou descansar por 5 minutos (esta etapa é importante para a lise das paredes e das membranas celulares, com liberação do conteúdo da célula).

Na etapa seguinte, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica (fornecidos pelo kit), transferiu-se o sobrenadante para o filtro e após filtração centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-se 400 µL do tampão CQW e centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 700 µL do tampão C5, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtrado (os tampões CQW e C5 contêm isotiocianato de guanidina, em concentrações decrescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e a retirada das outras biomoléculas da amostra. Também contêm etanol, para facilitar a precipitação). Por fim, foi feita outra centrifugação com o tubo vazio, por 1 minuto a 15.000 rpm.

Após isto, o filtro contendo DNA foi trocado para um eppendorf de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 µL do tampão Elution Buffer CE pré-aquecido a 70°C (este tampão favorece a eluição do DNA). Após uma pré-incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtro. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

#### 4.7 Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões gênicas a serem analisadas para *E. coli* e *S. aureus* foi realizada conforme busca na literatura e optou-se por duas regiões gênicas específicas, para os quais os oligonucleotídeos foram desenhados no presente estudo.

Para identificar *S. aureus* optou-se pela região gênica específica *entC* (anotação descrita para região gênica que codifica enterotoxina C do *S. aureus*). E para identificar *E. coli* optou-se pela região gênica específica *EutC* (anotação descrita para região gênica que codifica a etanolamina amônia liase em *E. coli*).

A partir da descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foram desenhados oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os parâmetros utilizados para a construção dos primers estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos**

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
T <sub>m</sub> do amplicon	75°C	85°C
Tamanho do amplicon	80 bases	600 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) para verificar a formação de dímeros, dobramento (hairpin) e  $\Delta G$  de formação de híbridos. Os primers específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo**

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Produto estimado	Espécie
entC_F	GCGTAATTTTGATATTCGCACTT	202 pb	<i>S. aureus</i>
entC_R	AAATCATGTGCCAAAATTTATCT		
EutC_F	TCTATGGGCTGTGACTGCTG	113 pb	<i>E. coli</i>
EutC_R	GGCATCCCCATGATGTAGTT		

#### 4.8 PCR qualitativo

Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 95°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos.

Foram utilizados, para cada reação de PCR: 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação com a amplificação de 10 ng de DNA extraído (2,5ng/µL) da amostra bacteriana (Tabela 4).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®).

**Tabela 4. Reagentes utilizados para realização da reação de PCR**

<b>Reagente (quantidade/ concentração do estoque)</b>	<b>Volume</b>
DNA molde 10 ng (2,5ng/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L
Tampão Taq 10 x	2,5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0,7 $\mu$ L
Mistura dos 4 nucleotídeos - dNTP 2,5 Mm	1,25 $\mu$ L
Oligo F 10 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
Oligo R 10 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
Taq DNA polimerase 5U/ $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
Água Miliq	Qsp. 25 $\mu$ L
	25 $\mu$ L

#### 4.9 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de extração do DNA e PCR foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel é de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no início foi usado a voltagem de 50 V e após começar a correr o gel, aumentou-se a voltagem para 100 V. Utilizou-se o marcador de 100 pB (pares de bases). Foi adicionado 3  $\mu$ L de corante Bromophenol (que tem a função de fazer uma ligação na amostra de DNA e permitir a visualização da corrida no gel de agarose) em 7  $\mu$ L de amostra. Para o preparo do gel foi utilizado TBE (Tris- Ácido Bórico), agarose e brometo de etídio (que tem função de corar o gel e permitir a visualização do DNA, quando colocado à luz ultravioleta).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas

Durante as análises deste estudo, observou-se um grande crescimento de colônias nas diluições  $10^{-1}$  não possibilitando a contagem das mesmas, portanto foram escolhidas as placas possíveis de serem contadas, sendo geralmente escolhidas as diluições de  $10^{-2}$  ou  $10^{-3}$  para bactérias mesófilas e  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  para bactérias psicrotróficas. A tabela 5 mostra os resultados da contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de vegetais minimamente processados avaliados neste estudo, que foram expressos como média de UFC/g e log de UFC/g com o desvio padrão.

**Tabela 5. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de vegetais minimamente processados**

Amostras	Bactérias mesófilas		Bactérias psicrotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g $\pm$ DP	UFC/g	Log UFC/g $\pm$ DP
Amostra 1	$3,7 \times 10^5$	$5,5 \pm 0,59$	$7,8 \times 10^5$	$5,9 \pm 0,38$
Amostra 2	$3,2 \times 10^6$	$6,5 \pm 0,25$	$1,8 \times 10^7$	$7,2 \pm 0,33$
Amostra 3	$2,3 \times 10^4$	$4,4 \pm 0,76$	$2,2 \times 10^6$	$6,3 \pm 0,13$
Amostra 4	$6,9 \times 10^6$	$5,3 \pm 1,22$	$3,1 \times 10^5$	$5,4 \pm 0,23$
Amostra 5	$4,2 \times 10^7$	$7,6 \pm 0,70$	$7,3 \times 10^7$	$7,9 \pm 0,04$
Amostra 6	$3,3 \times 10^6$	$6,5 \pm 0,52$	$4,6 \times 10^6$	$6,7 \pm 0,41$
Amostra 7	$2,6 \times 10^6$	$6,4 \pm 0,44$	$5,2 \times 10^6$	$6,7 \pm 0,39$
Amostra 8	$3,4 \times 10^4$	$4,5 \pm 1,92$	$9,1 \times 10^4$	$5,0 \pm 0,30$
Amostra 9	$2,0 \times 10^7$	$7,3 \pm 0,33$	$1,5 \times 10^6$	$6,2 \pm 0,30$
Amostra 10	$3,8 \times 10^5$	$5,6 \pm 0,28$	$6,2 \times 10^5$	$5,8 \pm 0,17$
Amostra 11	$3,3 \times 10^5$	$5,4 \pm 0,46$	$2,2 \times 10^6$	$6,2 \pm 0,43$
Amostra 12	$3,1 \times 10^4$	$6,3 \pm 0,47$	$1,3 \times 10^7$	$6,8 \pm 0,63$
Amostra 13	$6,4 \times 10^4$	$4,5 \pm 0,51$	$1,5 \times 10^4$	$4,0 \pm 0,45$

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata  
 DP = desvio padrão; UFC/g = unidades formadoras de colônia por grama

As análises de bactérias mesófilas são muito utilizadas como indicadores de qualidade microbiológica nos alimentos, pois estas podem indicar a qualidade no processo de produção, desde a limpeza até o armazenamento destes produtos (ICMSF, 2002). Pelos padrões estabelecidos pelo ICMSF (2002) permite-se uma contagem máxima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g de microrganismos aeróbios totais para os alimentos em geral. Após sanitização dos vegetais é esperado uma redução da carga microbiana para pelo menos  $10^5$  UFC/g (ICMSF, 2002). As bactérias mesófilas nos vegetais sanitizados são consideradas em alta quantidade quando se encontram acima de  $10^6$  UFC/g (SILVA JÚNIOR, 2008).

Ao analisar os resultados desse trabalho para a contagem de bactérias mesófilas, foi possível observar que das treze amostras, seis apresentaram quantidade acima de  $10^6$  UFC/g, variando de  $2,6 \times 10^6$  a  $4,2 \times 10^7$ . As amostras 5 e 9 (ambas de couve, mas de marcas diferentes) apresentaram contagens acima de  $10^7$  UFC/g. Com isso, é possível observar que 42,6% dos vegetais minimamente processados analisados apresentam valores de bactérias mesófilas acima do esperado para os vegetais sanitizados.

Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos no estudo de Santos (2015), onde a análise bactérias mesófilas em marcas de couve minimamente processadas apresentaram resultados incontáveis em todas as amostras analisadas. No trabalho realizado por Barbosa (2014), foi feita a avaliação microbiológica de seis amostras de couves minimamente processadas comercializadas em Brasília e foi observada uma alta contagem de bactérias mesófilas variando entre  $7,2 \times 10^6$  a  $2,1 \times 10^7$ . E no estudo de Rocha (2014), realizado no estado de São Paulo, as contagens de mesófilos em amostras de couves minimamente processadas foram altas em quatro amostras analisadas, variando entre  $1,3 \times 10^7$  a  $2,1 \times 10^8$ .

As bactérias psicotróficas são capazes de se desenvolver em temperaturas baixas como as de armazenamento dos PMP (PINTO, 2007). Os microrganismos aeróbios psicotróficos em número elevado são responsáveis pela diminuição da vida de prateleira dos alimentos refrigerados (APHA, 2001). No presente estudo, as contagens de bactérias psicotróficas foram elevadas em oito das treze amostras analisadas, encontrando-se acima de  $10^6$  UFC/g, variando de  $1,5 \times 10^6$  a  $7,3 \times 10^7$ . As amostras 2 (salada de alface, rúcula, cenoura fatiada e tomate, marca 2), 5 (couve fatiada, marca 1) e 12 (couve fatiada, marca 2), apresentaram contagens acima de  $10^7$  UFC/g. Com isso, é possível observar que 61,5% dos vegetais minimamente

processados analisados apresentam valores de bactérias psicrotróficas acima do esperado para os vegetais sanitizados.

As altas cargas microbianas dos PMP observadas em variados estudos podem ser provenientes da microbiota original, adquirida no solo e meio ambiente, ou de contaminação adquirida durante o processo de produção e armazenamento dos vegetais minimamente processados. Uma fonte de contaminação muito característica ocorre no momento do corte desses vegetais, onde o aumento da carga microbiana varia de  $10^5$  a  $10^{10}$  UFC/g (GLEESON et. al., 2005; SILVA, 2006).

Outra provável causa para as elevadas concentrações de mesófilos observadas é a temperatura de armazenamento inadequada nas gôndolas dos supermercados, assim como em qualquer outra etapa do processo. O abuso da temperatura leva a uma rápida proliferação das bactérias mesófilas as quais apresentam uma alta taxa de crescimento a  $12^{\circ}\text{C}$ , levando a deterioração precoce dos produtos (ROCHA, 2014).

Outro ponto de possível aumento na carga bacteriana comprovado pela literatura é o tempo de armazenamento. Em um estudo realizado por Allende et al. (2004) com vegetais minimamente processados armazenados na temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$  após sete dias, foi possível observar um aumento de  $1,0 \times 10^5$  para  $1,0 \times 10^8$  UFC/g. Em outro estudo realizado por Lopez et al. (2003), também foi observado um aumento na contagem de mesófilos com o tempo de armazenamento, com variações de  $10^5$  para  $10^8$  UFC/g em amostras de cebola e de  $10^6$  para  $10^9$  UFC/g e em amostras de repolho, ambas minimamente processadas.

## **5.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes**

Os coliformes totais são pertencentes à família Enterobacteriaceae, bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares, produtores de ácidos e gás a  $35^{\circ}\text{C}$ , em até 48 horas, a partir da fermentação da lactose. Porém, estes são constituídos por aproximadamente 20 espécies, portanto sua presença não significa necessariamente contaminação fecal ou presença de patógenos. No entanto, a elevada quantidade de coliformes totais nos alimentos geralmente indica a presença

de coliformes termotolerantes, que são um subgrupo dos coliformes totais capazes de fermentar a lactose com produção de gás quando incubados em temperatura mais elevada, entre 44,5°C e 45,5°C por até 48 horas, sendo estes 90% das vezes *Escherichia coli* (BARBOSA, 2014; FRANCO & LANDGRAF, 2008; PINTO, 2007; SANTOS, 2008).

Nas análises realizadas neste trabalho, sete das treze amostras (53,9%) apresentaram elevada quantidade de coliformes totais, com enumeração acima de  $1,0 \times 10^3$  NMP/g (Tabela 6). Segundo Maffei et al. (2013), os vegetais frescos apresentam uma alta quantidade de coliformes totais como microbiota inicial vinda do solo, contudo é esperado que essa quantidade seja reduzida após processo de sanitização.

**Tabela 6. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de vegetais minimamente processados**

Amostras	Coliformes totais		Coliformes termotolerantes	
	NMP/g	Log NMP/g $\pm$ DP	NMP/g	Log NMP/g $\pm$ DP
Amostra 1	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$4,6 \times 10^1$	$0,66 \pm 0,20$
Amostra 2	$1,0 \times 10^2$	$2,01 \pm 0,66$	$4,5 \times 10^1$	$0,64 \pm 0,22$
Amostra 3	$8,1 \times 10^2$	$2,91 \pm 0,38$	$9,7 \times 10^1$	$0,98 \pm 0,10$
Amostra 4	$2,2 \times 10^2$	$2,35 \pm 1,20$	$5,1 \times 10^1$	$0,70 \pm 0,17$
Amostra 5	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$
Amostra 6	$8,1 \times 10^2$	$2,91 \pm 0,38$	$4,5 \times 10^2$	$2,65 \pm 0,53$
Amostra 7	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$5,0 \times 10^2$	$2,70 \pm 0,53$
Amostra 8	$2,1 \times 10^1$	$1,32 \pm 0,22$	$5,5 \times 10^1$	$1,87 \pm 0,93$
Amostra 9	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$
Amostra 10	$7,6 \times 10^1$	$1,88 \pm 0,79$	$1,6 \times 10^1$	$1,21 \pm 0,49$
Amostra 11	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$2,5 \times 10^1$	$1,39 \pm 0,08$
Amostra 12	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$1,5 \times 10^2$	$2,17 \pm 0,57$
Amostra 13	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$1,1 \times 10^2$	$1,84 \pm 0,56$

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata  
DP = desvio padrão; NMP/g = Número mais provável por grama



Coliformes termotolerantes são utilizados como indicadores de poluição fecal por serem de habitat exclusivamente do trato intestinal e quando presentes em alimentos indicam que há um risco de conter microrganismos patogênicos (FRANCO & LANDGRAF, 2008). Nas análises deste trabalho, foi possível observar que seis das treze amostras (46,2%) apresentaram valores de coliformes termotolerantes superior ao limite estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) para vegetais frescos que é de  $1,0 \times 10^2$  NMP/g. As amostras: 5- couve fatiada (marca 1); 6- salada de repolho verde e repolho roxo, ambos fatiados (marca 4); 7- salada de repolho verde, repolho roxo e cenoura, ambos fatiados (marca 5); 9- couve fatiada (marca 7); 12- couve fatiada (marca 2) e 13- repolho verde fatiado (marca 2), estavam impróprias para o consumo.

A presença de coliformes termotolerantes nos alimentos é indicativa de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênicosanitárias não satisfatórias, além de contaminação durante a manipulação do produto pelo manipulador ou até mesmo a higienização ineficiente dos equipamentos (ROCHA, 2014). A presença de coliformes termotolerantes além de indicar a presença de *E. coli* (na maioria das vezes), pode indicar também a possibilidade de ocorrência de outros enteropatógenos, como *Salmonella* e *Shigella* (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Resultados similares foram obtidos no estudo de Barbosa (2014), onde foi realizada a avaliação microbiológica de seis amostras de couves minimamente processadas comercializadas em Brasília e verificou-se que 50% das amostras estavam com valores de coliformes termotolerantes acima do limite estabelecido pela legislação. Em estudo realizado por Paula et al. (2008), que avaliaram a qualidade microbiológica de produtos minimamente processados comercializados em Lavras-MG, Brasília-DF e São Paulo-SP, todos os produtos avaliados apresentaram valores de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação, indicando falhas no padrão de qualidade. Oliveira et al. (2011), reportaram que de 162 amostras de vegetais minimamente processados coletados na cidade de Ribeirão Preto, SP, 107 amostras (66%) estavam com valores de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação (acima de 2 log NMP/g). Segundo Gagliardi & Karns (2000), a utilização de águas poluídas e esterco animal no cultivo das hortaliças são citados como as principais fontes desses microrganismos nesses produtos.

### 5.3 Determinação da presença de *Salmonella* sp.

Neste trabalho não houve detecção de *Salmonella* sp. nas amostras de vegetais minimamente processados analisadas. A legislação brasileira (BRASIL, 2001) determina que o gênero *Salmonella* sp. esteja ausente em 25 g da amostra. Resultados similares foram encontrados no estudo de Paula et al. (2008), onde não foi detectada *Salmonella* sp. nas análises de 144 amostras de vegetais minimamente comercializados em Lavras-MG, Brasília-DF e São Paulo-SP. No estudo de Oliveira et al. (2011), *Salmonella* sp. foi detectada em 2 amostras (1,2%) de 162 vegetais minimamente processados coletados na cidade de Ribeirão Preto, SP.

O gênero *Salmonella* tem grande importância na clínica, pois estas bactérias podem se adaptar em condições ambientais hostis e ocasionar surtos relacionados ao consumo de alimentos contaminados. Podem causar várias doenças nos seres humanos como, febre tifoide, febres entéricas, enterocolites e artrite reativa (D' Aoust, 2007).

*Salmonella* sp. é considerada uma das principais bactérias causadoras de DTA em vários países, inclusive o Brasil, sendo responsável por sérios problemas de saúde pública e perdas econômicas (CAPALONGA, 2014). As prováveis fontes de contaminação por esta bactéria são águas contaminadas com fezes ou até mesmo o contato com animais silvestres infectados. Esta tem como principal habitat o trato intestinal de aves, répteis e seres humanos (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

### 5.4 Contagem de *Staphylococcus* sp.

A Tabela 7 apresenta os resultados da contagem de bactérias *Staphylococcus* sp. nas amostras de vegetais minimamente processados analisadas neste estudo. Os resultados foram expressos como médias de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g). Nas análises deste trabalho, foi possível observar que cinco das treze amostras (38,4%) apresentaram cepas de *Staphylococcus* sp. No estudo posterior de biologia molecular, algumas amostras foram testadas e foram geneticamente confirmadas como *S. aureus*.

**Tabela 7. Contagem das colônias no *Staphylococcus* sp. (colônias fermentadoras de manitol e após coloração de gram), nas amostras de vegetais minimamente processados**

<i>Staphylococcus ssp.</i>			
<b>Amostras</b>	<b>UFC/g</b>	<b>Amostras</b>	<b>UFC/g</b>
Amostra 1	ND	Amostra 8	$6,7 \times 10^1$
Amostra 2	$7,0 \times 10^2$	Amostra 9	$2,7 \times 10^3$
Amostra 3	ND	Amostra 10	ND
Amostra 4	ND	Amostra 11	ND
Amostra 5	$3,1 \times 10^4$	Amostra 12	ND
Amostra 6	$4,3 \times 10^2$	Amostra 13	ND
Amostra 7	$6,7 \times 10^1$		

ND = não detectado.

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata

A presença de *S. aureus* em números inferiores a  $1,0 \times 10^3$  UFC/g nas amostras 2, 6, 7 e 8 indicou condições higiênicas inapropriadas e/ou processamento deficiente, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) estabelece o valor limite de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g para contagem de *Staphylococcus aureus* nas saladas prontas para o consumo. Nos resultados deste estudo, as amostras 9 e 5 (ambas de couve, mas de marcas diferentes) estavam com contagens de *S. aureus* acima do limite, sendo então consideradas impróprias para o consumo humano.

Segundo Franco e Landgraf (2008), é necessário que a população de *Staphylococcus aureus* seja de pelo menos  $10^5$  UFC/g no alimento para que haja a formação da toxina em quantidades capazes de causar intoxicação alimentar, níveis que podem ser alcançados quando a contagem inicial já ultrapassa o limite de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g

A presença de *S. aureus* acima dos limites preconizados na legislação indica condições higiênicas precárias ou falha no processamento (SORIANO et al., 2002). Por se tratar de uma bactéria em que o habitat principal são os humanos, as chances de contaminação através do manipulador são altas, visto que os produtos minimamente processados requerem uma considerável manipulação para o seu

preparo (SANTANA, 2010). Nos Estados Unidos, 12,3% dos surtos alimentares causados por este patógeno foram originados do consumo de saladas (LOIR et.al., 2003).

### 5.5 Análises moleculares

No presente estudo, algumas colônias suspeitas de serem *E. coli* provenientes das diferentes amostras dos vegetais minimamente processados foram geneticamente confirmadas como *E. coli*, após as análises moleculares (Tabela 8).

**Tabela 8. Identificação por meio de PCR de bactérias *Escherichia coli* isoladas das amostras de vegetais minimamente processados**

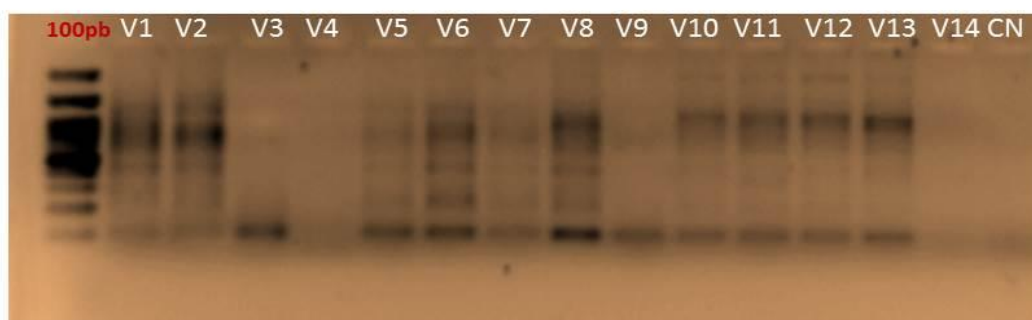
Número da colônia	Amostra	Resultado molecular
V1	1) salada de alface e cenoura fatiada	<i>Escherichia coli</i>
V2	3) acelga picada	<i>Escherichia coli</i>
V3	5) couve fatiada (marca 1)	<i>Escherichia coli</i>
V4	5) couve fatiada (marca 1)	Negativo para <i>E. coli</i>
V5	6) salada de repolho verde e repolho roxo	<i>Escherichia coli</i>
V6	2) alface, rúcula, cenoura e tomate	<i>Escherichia coli</i>
V7	4) broto de girassol	<i>Escherichia coli</i>
V8	4) broto de girassol	<i>Escherichia coli</i>
V9	7) salada de repolho verde, roxo e cenoura	<i>Escherichia coli</i>
V10	7) salada de repolho verde, roxo e cenoura	<i>Escherichia coli</i>
V11	7) salada de repolho verde, roxo e cenoura	<i>Escherichia coli</i>
V12	9) couve fatiada (marca 7)	<i>Escherichia coli</i>
V13	9) couve fatiada (marca 7)	<i>Escherichia coli</i>
V14	9) couve fatiada (marca 7)	Negativo para <i>E. coli</i>
CN	Controle negativo <i>E. Coli</i>	-----

Foi observado que das 13 amostras de vegetais minimamente processados analisadas, 8 amostras (61,5%) tiveram cepas de *E. coli* confirmadas por PCR. As

amostras 1, 2, 3 e 4 apesar de apresentarem cepas de *E. coli*, estavam dentro dos limites aceitáveis de coliformes termotolerantes estabelecidos pela legislação. Já as amostras 5, 6, 7 e 9 estavam impróprias para o consumo.

Foi possível observar na Figura 2 que houve amplificação da região gênica *EutC* nas colônias de *E. coli*. Essa é a região que codifica a enzima etanolamina amônia liase em *E. coli*. A sequência utilizada nesse estudo é específica para detecção de *E. coli* e referenciada na literatura por Wang et al. (1997) como uma região promotora do gene *malB* (sistema de maltose) e pode ser adotada para identificar qualquer sorotipo desta espécie.

A etanolamina amônia liase é uma enzima que pertence às vias dependentes de vitamina B12 em bactérias. A utilização de etanolamina como fonte única de carbono e energia requer vitamina B12 para as funções de indutor da via catabólica e cofator da enzima etanolamina amônia liase. Etanolamina amônia liase é a primeira enzima da via que converte etanolamina a acetaldeído e amônia, sendo que acetaldeído serve como fonte de carbono e energia ao ser convertido em acetil-coA e a amônia serve como fonte de nitrogênio. A etanolamina é facilmente encontrada na natureza, pois está presente nos fosfolipídios das membranas celulares como a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilcolina (PAIVA, 2010).



**Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *EutC* de *E. coli*. 100pb = marcador de 100 pb; V1 a V14 = amostras deste estudo testadas para amplicons de *EutC* (113 pb); CN = Controle Negativo**

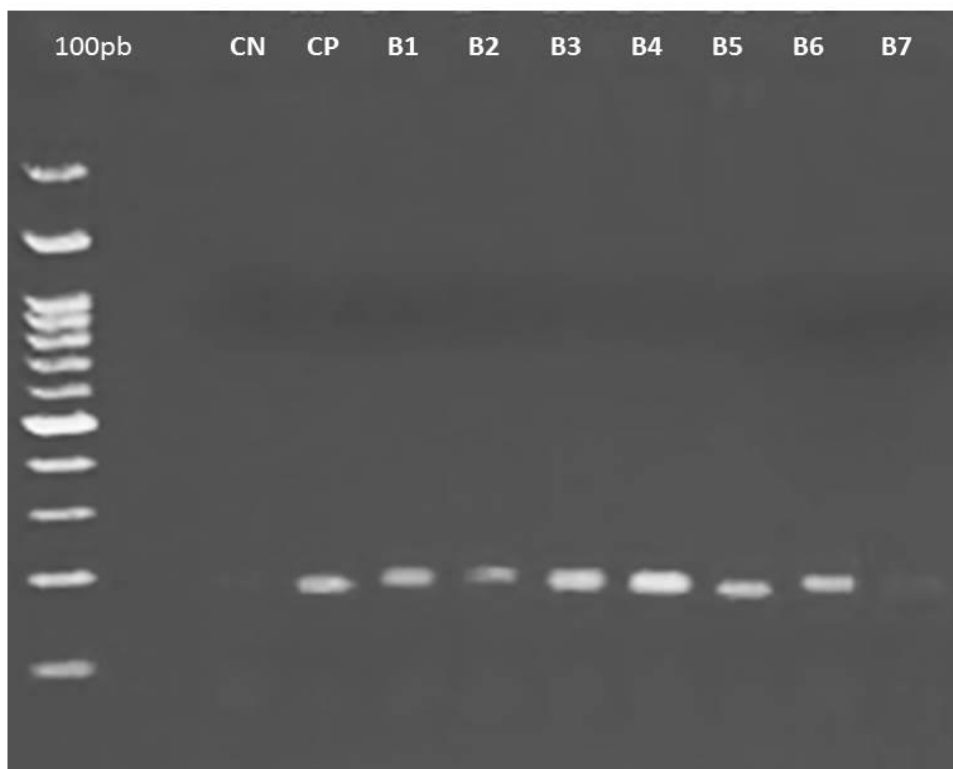
E por fim, algumas colônias suspeitas de serem *S. aureus* provenientes das diferentes amostras dos vegetais minimamente processados foram geneticamente confirmadas como *S. aureus*, após as análises moleculares (Tabela 9). As amostras de couve 5 e 9 apresentaram contagens de *S. aureus* acima do permitido pela legislação brasileira e seu consumo representaria risco à saúde do consumidor, pois a região genica *EntC* identificada nessas bactérias indicou que essas cepas eram produtoras de enterotoxinas.

**Tabela 9. Identificação por meio de PCR de bactérias *Staphylococcus aureus* isoladas das amostras de vegetais minimamente processados**

<b>Número da colônia</b>	<b>Amostra</b>	<b>Resultado molecular</b>
CN	Controle negativo	----
CP	Controle positivo (ATCC 33862)	<i>S. aureus</i>
B1	5) couve fatiada (marca 1)	<i>S. aureus</i>
B2	5) couve fatiada (marca 1)	<i>S. aureus</i>
B3	5) couve fatiada (marca 1)	<i>S. aureus</i>
B4	6) salada de repolho verde e repolho roxo	<i>S. aureus</i>
B5	6) salada de repolho verde e repolho roxo	<i>S. aureus</i>
B6	9) couve fatiada (marca 7)	<i>S. aureus</i>
B7	9) couve fatiada (marca 7)	Negativo para <i>S. aureus</i>

Foi possível observar na Figura 3 que houve amplificação da região gênica *entC* nas colônias de *S. aureus*. A região gênica *entC* mostrou forte correlação com a produção de enterotoxinas e no estudo de Tamarapu et al. (2001) foi proposto para identificar *S. aureus* produtor de enterotoxinas. As enterotoxinas estafilocócicas são consideradas superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação, ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções hepáticas e renais. O grupo da toxina C (SEC) é formado por três subtipos antigênicos distintos e denominados de SEC1, SEC2 e SEC. A enterotoxina C é

heterogênea e apresenta variações antigênicas em sua sequência molecular, ocorrendo ainda, as variantes SEC bovina e SEC ovina, cuja classificação é baseada em diferenças antigênicas e no animal hospedeiro da qual foi isolada (TAMARAPU et al., 2001).



**Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *entC* de *S. aureus*. 100pb= marcador de 100 pb; B1 a B7 = amostras deste estudo testadas para amplicons de *entC* (202 pb); CP=controle positivo; CN = Controle Negativo**

### 5.6 Análise geral

Ao analisar as amostras dos vegetais minimamente processados como um todo é possível observar qual amostra se encontrou em boas condições para o consumo e qual amostra estava reprovada devido à baixa qualidade microbiológica, como mostrado na tabela 10. Das treze amostras analisadas neste estudo, seis amostras (5, 6, 7, 9, 12 e 13) estavam reprovadas para o consumo humano. As amostras 1, 2, 8 e 11 foram consideradas satisfatórias para o consumo, pois apresentaram quantidade

significativa de bactérias mesófilas ou psicotróficas ou coliformes totais e/ou *S. aureus*. Já as amostras 3, 4 e 10 foram consideradas aprovadas para o consumo, com boa qualidade microbiológica.

**Tabela 10. Classificação e detalhamento de amostras de vegetais minimamente processados aprovadas, satisfatórias e reprovadas para consumo humano.**

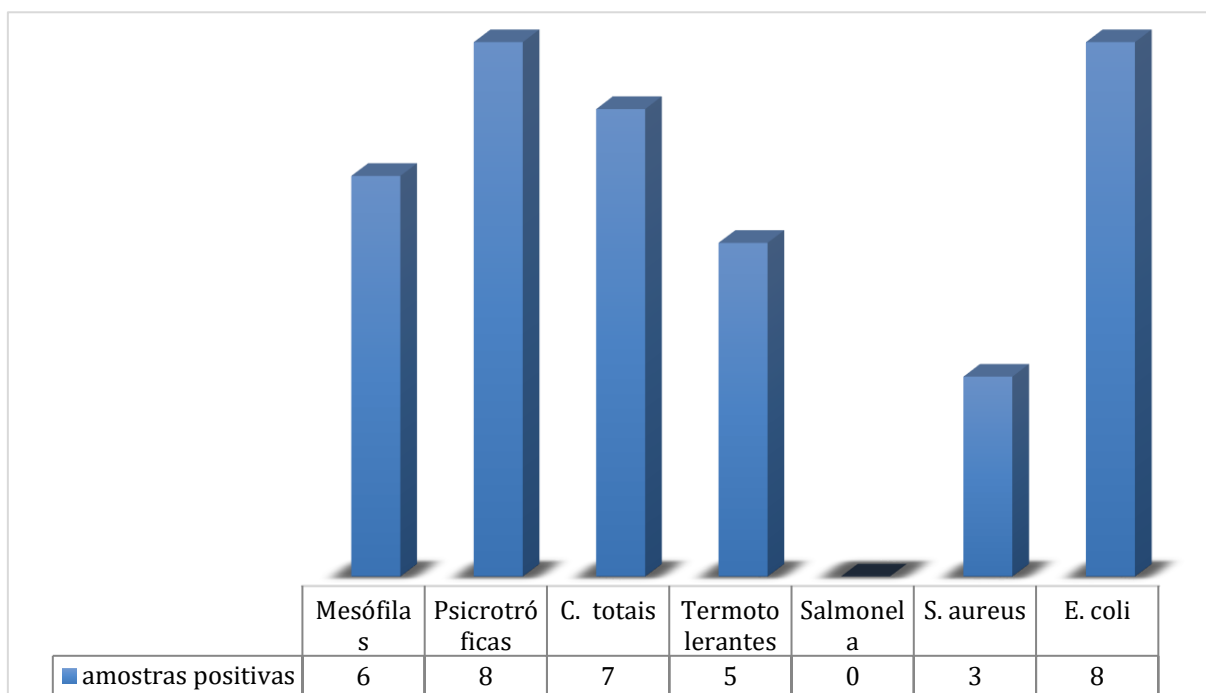
Amostra	Composição e marca	Microrganismos encontrados em quantidade significativa	Microrganismos encontrados acima do permitido pela legislação	A/R/S
1	Salada de alface e cenoura fatiada (marca 1)	Coliformes totais	-----	S
2	Salada de alface, rúcula, cenoura e tomate (marca 2)	Bactérias psicotróficas	-----	S
3	Acelga picada (marca 1)	-----	-----	A
4	Broto de girassol (marca 3)	-----	-----	A
5	Couve fatiada (marca 1)	Bactérias mesófilas, psicotróficas e coliformes totais	Coliformes termotolerantes, <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	R
6	Salada de repolho verde e repolho roxo (marca 4)	<i>S. aureus</i>	Coliformes termotolerantes e <i>E. coli</i>	R
7	Repolho verde, repolho roxo e cenoura (marca 5)	Coliformes totais e <i>S. aureus</i>	Coliformes termotolerantes e <i>E. coli</i>	R
8	Alface, tomate, milho, queijo e cogumelo (marca 6)	<i>S. aureus</i>	----	S
9	Couve fatiada (marca 7)	Bactérias mesófilas e coliformes totais	Coliformes termotolerantes, <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	R
10	Salada de radichio (marca 8)	----	----	A
11	Salada de alface (marca 2)	Coliformes totais	----	S
12	Couve fatiada (marca 2)	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	R
13	Repolho verde fatiado (marca 2)	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	R

**A= aprovada; S = satisfatório; R= reprovada**

No gráfico 1 é possível observar as bactérias que foram encontradas nas diversas amostras de vegetais minimamente processados, exceto *Salmonella*, que não foi identificada em nenhuma delas.



**Gráfico 1. Quantidade de amostras de vegetais minimamente processados positivos para cada bactéria pesquisada**



## 6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, das treze diferentes amostras de vegetais minimamente processados comercializadas nos supermercados de Brasília, seis amostras (46,2%) estavam inadequadas para o consumo humano, não atendendo aos padrões mínimos de qualidade microbiológica. Essas amostras apresentaram valores de coliformes termotolerantes superior ao limite estabelecido pela legislação brasileira para vegetais frescos que é de  $1,0 \times 10^2$  NMP/g. Foi possível observar que cinco amostras (38,4%) apresentaram cepas de *S. aureus*. Apesar do número aceitável de bactérias *S. aureus* em três dessas amostras, a presença de *S. aureus* mostrou condições higiênicas insatisfatórias por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana. As amostras de couve 5 e 9 que já haviam sido reprovadas pelo excesso de coliformes termotolerantes, apresentaram contagens de *S. aureus* acima do permitido pela legislação brasileira e seu consumo representaria risco à saúde do consumidor, pois a região gênica *EntC* identificada nessas bactérias indicou que essas cepas eram produtoras de enterotoxinas.

As altas cargas microbianas desses produtos podem ser provenientes da microbiota original, adquirida no solo e meio ambiente, ou de contaminação adquirida durante o processo de produção e armazenamento dos vegetais minimamente processados. Outra provável causa para as elevadas concentrações de bactérias observadas é a temperatura de armazenamento inadequada nas gôndolas dos supermercados, assim como em qualquer outra etapa do processo. Outro ponto possível do aumento na carga bacteriana é o excessivo tempo de armazenamento desses produtos, sugerindo que 7 a 10 dias de validade é um prazo inadequado para a conservação de produtos tão perecíveis. Portanto, a indústria de produtos minimamente processados e os supermercados devem rever suas Boas Práticas de Fabricação de forma a garantir aos consumidores que seus produtos estejam seguros e sem contaminantes que possam prejudicar a saúde do consumidor.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENDE, A.; AGUAYO, E.; ARTÉS, F. Microbial and sensory quality of comercial fresh processed red lettuce throughout the production chain and shelf life. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, v.91, p. 109-117, 2004.

APHA – American Public Health Association. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association, 676p, 2001.

AMSON, V. G., HARACEMIV, C. M. S., MASSON, L. M. Levantamento de dados epidemiológicos relativos às ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Manual de Microbiologia Clínica para Serviços de Saúde**, Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, Módulo IV, Brasília, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HORTICULTURA. **Preparo rápido é tendência**. 2005. Disponível em: < <http://www.abhorticultura.com.br/News/Default.asp?id=1534>>. Acesso em: 21 de abril, 2016.

BARBOSA, T. A. **Avaliação da Qualidade microbiológica da couve minimamente processada comercializada nos supermercados de Brasília**. 2014. 61f. Monografia (conclusão de curso) – Universidade de Brasília, 2014.

BASTOS, C. P. **Multiplex PCR para identificação de *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus***. 2008. 55f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 12 de 02 de janeiro de 2001, **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, DF, 2001.

CAPALONGA, R. **Estudo das características Fenotípicas e Genotípicas das *Salmonellas enteretidis* envolvidas em surtos alimentares no estado do Rio Grande do Sul no período de 2007 a 2013.** 2014. 67f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

COOLEY, M. B., MILLER, W. G., MANDRELL, R. E. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4915–4926, 2003.

DELAQUIS, P., BACH, S., DINU, L. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables: a review. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 1966–1974, 2007.

D' Aoust, J. Y. Current foodborne pathogens: *Salmonella*. **Food Safety Handbook: Microbiological Challenges**, França, p. 128-141, 2007.

EMBRAPA. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**, Brasília, DF, 531 p., 2007.

FARBER, J. M. et al. Molecular typing and differentiation. In: FARBER, J.M. et al. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C.: APHA, 2001. cap. 11, p. 127-158.

FDA, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce.** 2001.

FENG, P; WEAGENT, SD; GRANT, MA. **Bacteriological Analytical Manual Online: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**, 2002. Disponível em: <[www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web\\_root/collection/available/etd04102005-213953/unrestricted/etd.pdf](http://www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web_root/collection/available/etd04102005-213953/unrestricted/etd.pdf)>. Acesso em 10 de março de 2016.

FLÔRES, M. L. et al. Análise da contaminação por *Salmonella* em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. **Ciência Rural**, v.33, n.3, pag. 553-557, Santa Maria, 2003.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. **Editora Atheneu**, São Paulo, 2008.

GANDRA, E. A., GANDRA, T. K. V., MELLO, W. S., GODOI, H. S. G. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GANGLIARDI, J. V.; KARNS, J. S. Leaching of *Escherichia coli* 0157: H7 in diverse soils under various agricultural management practices. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 877-883, 2000.

GIL, M. I., SELMA, M. V., LOPEZ-GALVEZ, F., ALLENDE, A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology** v. 134, p. 37–45, 2009.

GLEESON, E.; O'BEIRNE, D. Effects of process severity on survival and growth of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on minimally processed vegetables. **Food Control**, Guildford, v.16, p. 677-685, 2005.

GOODBURN, C.; WALLACE C. A. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review, **Food Control**, v. 32, p. 418-427, 2013.

HANNING, I. B.; RICKE, S. C. Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n.6, p. 635-648, 2009.

ICMSF – Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management. New York: Kluwer Academic, 2002.

IFPA - International Fresh-cut Produce Association. **Food safety guidelines for the fresh-cut produce industry**.4. ed., 2001. 213 p.

LOIR, Y. L., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetic Molecular Reserve**, v. 2 n. 1 p. 63-76, 2003.

LOPÉZ, V. L.; ROMERO, R. J.; DUARTE, F. F. Calidad microbiológica y efecto del lavado y desinfección em vegetales pretrozados expendidos em Chile. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 53, n4, p.383-388, 2003.

MAFFEI, D. F.; SILVEIRA, N. F. A.; CATANOZI, M. P. L. M. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil. **Food Control**, v. 29, p. 226-230, 2013.

MARIN, V. A. et al. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: a falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.

NASCIMENTO, E. F. et al. **Avaliação da temperatura de comercialização de hortaliças minimamente processadas no mercado varejista do Distrito Federal**. Disponível em: <<http://www.abhorticultura.com.br>>. Acesso em: 23 de março 2016.

OLIVEIRA, M. A. et al. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, p. 1400-1403, 2011.

PAIVA, J. B. **Infecção de aves por mutantes de *Salmonella sorotipos gallinarum, pullorum e enteritidis* com deleção nos genes *cobS* E *cbiA***. 2010. 96 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010.

PAULA, N. R. F. et al. Qualidade de produtos minimamente processados e comercializados em gôndolas de supermercados nas cidades de Lavras – MG, Brasília – DF e São Paulo – SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 219-227, 2008.

PINTO, D. M. **Qualidade de produtos minimamente processados comercializados em diferentes épocas do ano**. 2007. 127 f. Dissertação (mestrado) – UFLA – Universidade Federal de Lavras, 2007.

ROCHA, G. G. et al. Qualidade microbiológica de couve manteiga (*Brassica oleracea*) minimamente processada comercializada em São Paulo, Brasil. **Revista Univap**, v. 20, n. 36, dez.2014.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTOS, A. P. **Conformação da qualidade microbiológica em couve minimamente processada no Distrito Federal: o caso da agroindústria Machadinho**. 2008. 120 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Universidade de Brasília, 2008

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6. ed. São Paulo: Varela, 2008. 625p.

SILVA, S. R. P. **Avaliação bacteriológica e parasitológica em hortaliças minimamente processadas e comercializadas em Porto Alegre**. 2006. 87f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2006.

SODERSTROM, A., OSTERBERG, P., LINGQUIST, A., JOHNSON, B., LINBERG, A., et al. A larger *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Sweden associated with locally produced lettuce. **Foodborne Pathogenic Diseases**, v. 5, p. 339–349, 2008.

SORIANO, J. M.; FONT, G.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic *staphylococci* and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 60-67, 2002.

TAMARAPU, S.; MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.

TOURNAS, V. H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 1, p.71-77, 2005.

TRESSELER, J. K., FIGUEIREDO, E. A. T., MACHADO, T. F., DEFINO, C. M., SOUSA, P. H. M. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1722 -1727, 2009.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 727-736, 1997.

WOOD, J. D., BEZANSON, G. S., GORDON, R. J., JAMIESON, R. Population dynamics of *Escherichia coli* inoculated by irrigation into the phyllosphere of spinach grown under commercial production conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 198–204, 2010.

ZAHA, A., FERREIRA, H. B., PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. 3ª ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 424p. 2003.

ZOCHE, F. et al. PCR multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Interciencia**, v.34, n.7, Rio Grande do Sul, 2009.



## Anexo 1. Genoma completo de *Escherichia coli*

### Escherichia coli strain Ecol\_732, complete genome

GenBank: CP015138.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) 

```

LOCUS       CP015138               308 bp    DNA     linear   BCT 08-APR-2016
DEFINITION  Escherichia coli strain Ecol_732, complete genome.
ACCESSION   CP015138 REGION: 3347690..3347997
VERSION     CP015138.1  GI:1016298593
DBLINK      BioProject: PRJNA316786
            BioSample: SAMN04621897
KEYWORDS    .
SOURCE      Escherichia coli
  ORGANISM  Escherichia coli
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
            Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE   1 (bases 1 to 308)
  AUTHORS   Stoesser,N., Sheppard,A., Peirano,G., Sebra,R., Lynch,T., Anson,L.,
            Kasarskis,A., Motyl,M., Kazmierczak,K., Crook,D. and Pitout,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-APR-2016) Department of Microbiology (Research), John
            Radcliffe Hospital, University of Oxford, Headley Way, Oxford OX3
            9DU, United Kingdom
COMMENT     Bacteria available from Johann Pitout, University of Calgary
            Laboratory Services, Calgary, Alberta, Canada, or Nicole Stoesser,
            Department of Microbiology, John Radcliffe Hospital, Headley Way,
            Oxford, UK.
            Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation
            Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can be
            found here: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\_prok/

##Genome-Assembly-Data-START##
Assembly Method      :: HGAP v. 2.2.0
Genome Coverage      :: 1x
Sequencing Technology :: PacBio
##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Assembly-Data-START##
Assembly Method      :: HGAP v. 2.2.0
Genome Coverage      :: 1x
Sequencing Technology :: PacBio
##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##
Annotation Provider  :: NCBI
Annotation Date      :: 04/08/2016 11:05:46
Annotation Pipeline  :: NCBI Prokaryotic Genome
                    Annotation Pipeline
Annotation Method     :: Best-placed reference protein
                    set; GeneMarkS+
Annotation Software revision :: 3.1
Features Annotated   :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA;
                    repeat_region
Genes (total)        :: 5,476
CDS (total)          :: 5,363
Genes (coding)       :: 5,243
CDS (coding)         :: 5,243
Genes (RNA)          :: 113
rRNAs                :: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)
complete rRNAs      :: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)
tRNAs                :: 86
ncRNAs               :: 5
Pseudo Genes (total) :: 120
Pseudo Genes (ambiguous residues) :: 0 of 120
Pseudo Genes (frameshifted) :: 52 of 120
Pseudo Genes (incomplete) :: 63 of 120
Pseudo Genes (internal stop) :: 19 of 120
Pseudo Genes (multiple problems) :: 12 of 120
##Genome-Annotation-Data-END##

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..308
                       /organism="Escherichia coli"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /strain="Ecol_732"
                       /host="Homo sapiens"
                       /db_xref="taxon:562"
                       /country="Thailand: Bangkok"
                       /lat_lon="13.76 N 100.50 E"
                       /collection_date="2012"
                       /collected_by="Merck Study for Monitoring of Antimicrobial
                       Resistance Trends (SMART)"
     gene              <1..>308
                       /locus_tag="A4X18_16425"
     CDS               <1..>308
  
```

```

/locus_tag="A4X18_16425"
/inference="EXISTENCE: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_000769998.1"
/note="with EutC catalyzes the formation of acetaldehyde
and ammonia from ethanolamine; Derived by automated
computational analysis using gene prediction method:
Protein Homology."
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ethanolamine ammonia-lyase"
/protein_id="AMX14968.1"
/db_xref="GI:1016301601"
/translation="MKLKTTLFGNVYQFKDVKEVLAKANELRSGDVLGVAASSQER
VAAKQVLSEMTVADIRNNPVIAYEDDCVTRLIQDDVNETAYNQIKNWSISELREYVLS
DETSVDDIAFTRKGLTSEVVAAVAKICSNADLIYGAKKMPVIKKANTTIGIPGTF SAR
LQPNDRDDVQSIAAQIYEGLSFGVGDVIGVNPVTDDVENLSRVLDTIYGVIDKFNI
PTQGCILAHVTTQIEAIRRGAPGGLIFQSIGSEKGLKEFGVELAMLDEARAVGAEFN
RIAGENCLYFETGQGSALSAGANFGADQVTMEARNYGLARHYDPFIVNTVVGF IGPEY
LYNDRQIIRAGLEDHFMGKLSGISMGDCCYTNHADADQNLNENLMILLATAGCNYIM
GMPLGDDIMLNYQTTAFHDTATVRQLLNLRPSPEFERWLESIMGIMANGRLTKRAGDPS
LFF"
ORIGIN
  1 tatctctaca acgaccgccca gattatccgc gcaggcttag aagatcactt tatgggcaaa
  61 ctgagcggca tctctatggg ctgtgactgc tgctacacca accacgctga cgctgaccag
  121 aacctcaacg aaaacctgat gatcctgctc gccaccgcag gctgcaacta catcatgggg
  181 atgccgctgg gcgatgacat catgctcaac tatcagacca ccgcattcca cgacactgcc
  241 actgtgcctc agttactgaa tctgcgcccg tcaccggagt ttgaacgctg gctgaaaagc
  301 atgggcat
//

```

## Anexo 2. Sequência de Primer para *E. coli*

Primer3Plus		<a href="#">Primer3Manager</a>	<a href="#">Help</a>
pick primers from a DNA sequence		<a href="#">About</a>	<a href="#">Source Code</a>
<b>WARNING: Numbers in input sequence were deleted.</b>			
<a href="#">&lt; Back</a>			
<b>Pair 1:</b>			
<input checked="" type="checkbox"/> Left Primer 1:	<input type="text" value="Primer_F"/>		
Sequence:	<input type="text" value="tctatgggctgtgactgctg"/>		
Start: 73	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
<input checked="" type="checkbox"/> Right Primer 1:	<input type="text" value="Primer_R"/>		
Sequence:	<input type="text" value="ggcatccccatgatgtagtt"/>		
Start: 185	Length: 20 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
Product Size: 113 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 0.0	
<input type="button" value="Send to Primer3Manager"/>	<input type="button" value="Reset Form"/>		
1	tatctctaca	acgaccgcca	gattatccgc gcaggcttag aagatcactt
51	tatgggcaaa	ctgagcggca	tctctatggg ctgtgactgc tgctacacca
101	accacgctga	cgctgaccag	aacctcaacg aaaacctgat gatcctgctc
151	gccaccgcag	gctgcaacta	catcatgggg atgccgctgg gcgatgacat
201	catgetcaac	tatcagacca	ccgcattcca cgacactgcc actgtgctgc
251	agttactgaa	tctgcgcccc	tcaccggagt ttgaacgctg gctggaaagc
301	atgggcat		
<input type="checkbox"/> Select all Primers			

### Anexo 3. Genoma completo de *S. aureus* precursor da enterotoxina C3

#### Staphylococcus aureus enterotoxin C3 precursor, gene, complete cds

GenBank: M28364.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) 

LOCUS STAENTXC 464 bp DNA linear BCT 05-NOV-2001  
 DEFINITION Staphylococcus aureus enterotoxin C3 precursor, gene, complete cds.  
 ACCESSION [M28364](#) REGION: 24..487  
 VERSION M28364.1 GI:153003  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Staphylococcus aureus  
 ORGANISM [Staphylococcus aureus](#)  
 Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae;  
 Staphylococcus.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 464)  
 AUTHORS Couch, J.L. and Betley, M.J.  
 TITLE Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene  
 suggests that intergenic recombination causes antigenic variation  
 J. Bacteriol. 171 (8), 4507-4510 (1989)  
 JOURNAL PUBMED [2473979](#)  
 FEATURES  
 source Location/Qualifiers  
 1..464  
 /organism="Staphylococcus aureus"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /strain="FRL1230"  
 /db\_xref="taxon:1280"  
 CDS  
 <1..>464  
 /codon\_start=1  
 /transl\_table=11  
 /product="enterotoxin C3 precursor"  
 /protein\_id="AAA26624.1"  
 /db\_xref="GI:153004"  
 /translation="MNKSRFISCVILIFALILVLFNVLAEQPDPTDELHKSSEF  
 TGTMGNMKYLDDHYVSATKVMVDKFLAHDLIYNISDKLKNYDKVKTLLNEDLAK  
 KYKDEVVDVYGSNYVNCYFSSKDNVGVKVTGGKTCMYGGITKHEGNHFDGNLQNVLI  
 RVYENKRNITISFEVQTDKKSVAQELDIKARNFLINKKNLYEFNSSPYETGYIKFIEIEN  
 NGNTFWYDMMPAPGDKFDQSKYLMYNDNKTVDKSKVKEVHLTTKNG"

ORIGIN

```

1 atgcgtaatt ttgatattcg cacttatact agttcttttt acaccaaacg tattagcaga
61 gagccaacca gaccctacgc cagatgagtt gcacaaatca agtgagtta ctggtacgat
121 gggtaatatg aaatatttat atgatgatca ttatgtatca gcaactaaag ttatgtctgt
181 agataaaattt ttggcacatg atttaattta taacattagt gataaaaaac taaaaaatta
241 tgacaaagtg aaaacagagt tattaaatga agatttagca aagaagtaca aagatgaagt
301 agttgatgtg tatggatcaa attactatgt aaactgctat ttttcatcca aagataatgt
361 aggtaaagtt acaggtggta aaacttgat gtatggagga ataacaaaac atgaaggaaa
421 ccactttgat aatgggaact tacaaaatgt acttataaga gttt

```

//

Anexo 4. Sequência de Primer para *S. aureus*

<b>Primer3Plus</b>		<a href="#">Primer3Manager</a>	<a href="#">Help</a>		
pick primers from a DNA sequence		<a href="#">About</a>	<a href="#">Source Code</a>		
<b>WARNING: Numbers in input sequence were deleted.</b>					
<a href="#">&lt; Back</a>					
<b>Pair 1:</b>					
<input checked="" type="checkbox"/> Left Primer 1:	<input type="text" value="Primer_F"/>				
Sequence:	<input type="text" value="gcgtaatttgatattgcactt"/>				
Start: 3	Length: 23 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 34.8 % ANY: 6.0 SELF: 2.0		
<input checked="" type="checkbox"/> Right Primer 1:	<input type="text" value="Primer_R"/>				
Sequence:	<input type="text" value="aaatcatgtgccaaaaattatct"/>				
Start: 204	Length: 24 bp	Tm: 58.1 °C	GC: 25.0 % ANY: 6.0 SELF: 2.0		
Product Size: 202 bp	Pair Any: 6.0	Pair End: 2.0			
<input type="button" value="Send to Primer3Manager"/>	<input type="button" value="Reset Form"/>				
1	atgcgtaatt	ttgatattcg	cacttatact	agttcttttt	acacccaacg
51	tattagcaga	gagccaacca	gacctacgc	cagatgagtt	gcacaaatca
101	agtgagtta	ctggtacgat	gggtaatatg	aaatatttat	atgatgatca
151	ttatgtatca	gcaactaaag	ttatgtctgt	agataaattt	ttggcacatg
201	attdaattta	taacattagt	gataaaaaac	taaaaaatta	tgacaaagtg
251	aaaacagagt	tattaaatga	agatttagca	aagaagtaca	aagatgaagt
301	agttgatgtg	tatggatcaa	attactatgt	aaactgctat	ttttcatcca
351	aagataatgt	aggtaaagtt	acagggtgta	aaacttgat	gtatggagga
401	ataacaaaac	atgaaggaaa	ccactttgat	aatggggaact	tacaaaatgt
451	acttataaga	gttt			
<input type="checkbox"/> Select all Primers					