

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

TALITA ARAUJO BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE COUVES
MINIMAMENTE PROCESSADA COMERCIALIZADA NOS
SUPERMERCADOS DE BRASÍLIA**

**BRASÍLIA, DF
2014**

TALITA ARAUJO BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE COUVES
MINIMAMENTE PROCESSADA COMERCIALIZADA NOS
SUPERMERCADOS DE BRASÍLIA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
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
2014

TALITA ARAUJO BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE COUVES
MINIMAMENTE PROCESSADA COMERCIALIZADA NOS
SUPERMERCADOS DE BRASÍLIA**

BANCA EXAMINADORA

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

Co-orientador: Profa Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Eliana Fortes Gris
(FCE/ Universidade de Brasília)

Dr. Paulo de Oliveira Martins
(Microbiologista do HuB e do HMiB)

BRASÍLIA, DF
2014

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus por ter me dado condições de chegar até aqui, por ter me sustentado em todos os momentos da minha vida. Ao meu esposo que sempre esteve ao meu lado me dando forças e me auxiliando, a minha família que foi uma base inquebrável e inabalável, vocês foram essenciais para que eu conseguisse realizar mais esse sonho.

A minha orientadora, Daniela Castilho Orsi e a minha co-orientadora Izabel Cristina que através dos seus ilimitáveis esforços me ampararam para que este trabalho fosse concluído. A toda equipe que auxiliou na produção deste trabalho, o professor mestre Daniel Oliveira e a Thais Mendes, muito obrigada pelo esforço e dedicação.

A todos os meus amigos e colegas que fizeram parte da minha formação, com vocês aprendi a reconhecer erros, a trabalhar em grupo e fazer o meu melhor.

A todo corpo docente da Universidade de Brasília que foram de suma importância para essa grande realização, foi com vocês que aprendi essa profissão maravilhosa.

RESUMO

A couve é uma hortaliça altamente consumida pela população brasileira, pode ser conservada por vários dias sob a forma minimamente processada, desde que manipulada, embalada e refrigerada adequadamente. Considerando que o Distrito Federal representa um importante mercado consumidor, este trabalho realizou a pesquisa das condições microbiológicas de 6 diferentes marcas de couve minimamente processada, comercializadas nos supermercados da cidade de Brasília. Nas amostras houve uma alta contagem de bactérias mesófilas ($7,2 \times 10^6$ a $3,5 \times 10^7$ UFC/g) e também de bactérias psicrófilas ($1,4 \times 10^6$ a $7,0 \times 10^7$ UFC/g). Das amostras analisadas, 3 delas (2, 3 e 5) apresentaram elevada enumeração de coliformes termotolerantes, indicando contaminação fecal. Na amostra 3, as análises moleculares detectaram patógenos entéricos importantes em doenças de origem alimentar como *Salmonella* entérica e *Escherichia coli* O157:H7. As 4 amostras (1, 2, 4 e 6) apresentaram elevada contagem de *S. aureus*, uma bactéria relacionada com falta de higiene durante a manipulação. Nos testes moleculares, várias amostras apresentaram a bactéria patogênica *Listeria monocytogenes*, que se multiplica nos alimentos refrigerados quando ocorre abuso da cadeia do frio, essencial na correta manutenção desses produtos. Também foi detectada uma alta contagem de bacilos gram positivos fermentadores de manitol em algumas amostras de couve, o que indica a presença elevada de microrganismos deterioradores e redução de vida de prateleira do produto. Neste trabalho, todas as 6 diferentes marcas de couve minimamente processada estavam impróprias para o consumo humano, pois não atenderam aos padrões de qualidade microbiológica exigidos pela legislação brasileira. A couve minimamente processada exposta ao consumo nos supermercados da cidade de Brasília está sendo distribuída com falta de qualidade microbiológica e seu consumo representa risco a saúde pública, sem garantia de segurança alimentar ao consumidor.

Palavras chave: couve, hortaliça minimamente processada, qualidade microbiológica, análises moleculares, PCR.

ABSTRACT

Kale is a vegetable highly consumed by the Brazilian population. The kale can be stored for several days as minimally processed, since manipulated, packaged and refrigerated properly, which proves convenient for your marketing. Whereas the Federal District is an important consumer market, this paper conducted the research of the microbiological quality of six different brands of minimally processed kale sold in supermarkets in the city of Brasilia. In the samples there was a high count of mesophilic bacteria (7.2×10^6 – 3.5×10^7 CFU/g) and also psychrotrophic bacteria (1.4×10^6 - 7.0×10^7 CFU/g). Of the samples taken, three of them (2, 3 and 5) have high enumeration of thermotolerant coliforms, indicating fecal contamination. In sample 3, molecular analyzes detected important enteric pathogens in food-borne diseases such as *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. The 4 samples (1, 2, 4 and 6) had high counts of *S. aureus*, a bacterium related to poor hygiene during handling. In molecular tests, several samples showed the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes*, which multiplies in refrigerated foods when abuse occurs in the cold chain, essential for proper maintenance of these products. It was also detected high count of bacilli gram positive mannitol fermenting in some samples of kale, indicating the presence of high spoilage microorganisms and reduced product shelf life. In this work, all six different brands of minimally processed kale were unfit for human consumption because it did not meet the standards of microbiological quality required by Brazilian law. The minimally processed kale exposed to consumption in supermarkets in the city of Brasilia is being distributed with lack of microbiological quality and its consumption represents a risk to public health, with no guarantee of food safety for the consumer.

Key words: kale, minimally processed vegetable, microbiological quality, molecular analyzes, PCR.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Produtos minimamente processados: conceitos e consumo no Distrito Federal	9
1.2	Processo de produção das hortaliças minimamente processadas	10
1.3	Processo de produção da couve minimamente processada	12
1.4	Qualidade microbiológica dos produtos minimamente processados	14
1.5	Contaminação microbiológica dos produtos minimamente processados.....	16
1.6	Uso da biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos	19
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	JUSTIFICATIVA.....	23
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	Coleta e preparo das amostras	24
4.2	Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas	24
4.3	Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes	25
4.4	Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i>	27
4.5	Contagem de <i>Staphylococcus sp.</i>	28
4.6	Análises moleculares	28
4.6.1	Extração de DNA bacteriano.....	28
4.6.2	Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	29
4.6.3	Digestão enzimática	31
4.6.4	Eletroforese em gel de agarose	31
4.6.5	Sequenciamento	32
4.7	Descarte de resíduos.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	Coleta das amostras da couve minimamente processada	33
5.2	Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas	33
5.3	Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes (<i>E. coli</i>)	35
5.4	Determinação da presença de <i>Salmonella sp.</i>	37

5.5	Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp.....	39
5.6	Detecção de bacilos gram positivos fermentadores de manitol.....	41
5.7	Análises moleculares	42
5.7.1	<i>Perfil de restrição para a região gênica 16S rRNA</i>	42
5.7.2	<i>Sequenciamento das amostras</i>	43
6	CONCLUSÃO.....	46
7	REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE TABELAS

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%.....	26
Tabela 2. Reagentes utilizados para realização da reação de PCR do gene universal.....	30
Tabela 3. Reagentes utilizados para realização da digestão do gene universal.....	31
Tabela 4. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de couve minimamente processada.....	34
Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de couve minimamente processada.....	36
Tabela 6. Contagem das colônias fermentadoras de manitol e contagem estimada de <i>Staphylococcus</i> sp., após coloração de gram.....	38
Tabela 7. Contagem das colônias fermentadoras de manitol e contagem estimada de bacilos gram positivos, após coloração de gram.....	41
Tabela 8. Identificação através do sequenciamento gênico de algumas bactérias isoladas das amostras de couve minimamente processada.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral descrevendo as operações da cadeia produtiva dos produtos minimamente processados de uma unidade industrial com as temperaturas recomendadas para cada etapa.....	11
Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI.....	28
Figura 3. Gel de agarose da digestão do amplicon do gene 16S rRNA das amostras com a enzima HaeIII, evidenciando diversos fragmentos próximos a 200 pb. Marcador = Marcador de 100pb. Nos poços seguintes, o primeiro número indica a amostra (de 1 a 6) e a numeração subsequente significa a réplica.....	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 – Identificação e genoma completo de algumas bactérias isoladas das amostras de couve minimamente processada.....	57
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos minimamente processados: conceitos e consumo no Distrito Federal

Os produtos minimamente processados (PMP), segundo o International Fresh-Cut Produce Association (IFPA, 2001), são frutas ou hortaliças modificadas fisicamente, porém com seu aspecto fresco mantido. E de acordo com SILVA (2008), o conceito de PMP deve contemplar a preservação das características organolépticas e sensoriais naturais do alimento para que as mesmas sejam atrativas ao consumidor.

Estes produtos estão cada vez mais presentes na alimentação da população, pois oferecem inúmeros benefícios, como por exemplo, redução do tempo de preparo das refeições, maior padronização e qualidade, aumento do acesso a alimentos saudáveis, menor espaço para armazenagem e redução do desperdício (ALLENDE et al., 2006; TOURNAS, 2005).

Segundo estudos realizados pelo SEBRAE (2008) alguns fatores contribuem para o aumento do consumo desses produtos, como por exemplo: crescimento da população idosa; aumento na participação da mulher no mercado de trabalho; aumento da distância entre o local de trabalho e a moradia; crescente procura por alimentos saudáveis, incluindo produtos frescos; e, demanda elevada de alimentos prontos. Este estudo ainda revela que o consumo de hortaliças minimamente processadas se dá principalmente por consumidores que possuem o poder aquisitivo mais elevado.

As hortaliças são consideradas parte importante da dieta humana, pois são ricas em vitaminas e sais minerais considerados nutrientes essenciais para o funcionamento adequado do organismo humano e ainda auxiliam na prevenção de doenças. Segundo o American Institute of Cancer Research (2014) o consumo regular de frutas e hortaliças variadas pode reduzir de 60 a 70% o risco de desenvolver alguma forma de câncer.

Segundo o Ministério da Integração Nacional (BRASIL, 2004), as hortaliças minimamente processadas já estão inclusas ativamente no mercado a varejo de hortaliças frescas. No Distrito Federal (DF) a preferência dos consumidores por hortaliças minimamente processadas foi de 29% em 2004. Segundo NASCIMENTO et al. (2014) o DF produz anualmente uma média de 200 toneladas de frutas e hortaliças minimamente processadas que são comercializadas nos supermercados espalhados por Brasília e pelas cidades satélites.

Dentre as hortaliças mais consumidas no Brasil, a couve (*Brassica oleracea*) é uma hortaliça arbustiva anual, que produz folhas que podem ser consumidas tanto cruas, em salada, como cozidas. É grande a sua demanda em médios e grandes centros urbanos brasileiros. Em Brasília, DF, por exemplo, foram consumidas, mensalmente, cerca de doze toneladas de couve minimamente processada no ano de 2007. A couve pode ser conservada por vários dias sob a forma minimamente processada, desde que manuseada, embalada e refrigerada adequadamente, o que se mostra conveniente para a sua comercialização (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

1.2 Processo de produção das hortaliças minimamente processadas

Para que a hortaliça “*in natura*” seja modificada fisicamente para se tornar um PMP é necessário diversas operações que protejam essas matérias primas de danos físicos e mecânicos, de contaminação microbiológica, física e por insetos. Frequentemente esses problemas ocorrem devido ao manuseio impróprio da matéria prima e da falta de higiene dos manipuladores (EMBRAPA, 2011).

As etapas através das quais as hortaliças são minimamente processadas, basicamente, são: pré-seleção, classificação, lavagem, corte, sanitização, enxague, centrifugação, embalagem e armazenamento refrigerado (TRESSELER et al., 2009). Em alguns casos, os produtos são submetidos ao processo de branqueamento, que consiste na inativação de enzimas através do choque térmico. Porém as qualidades dos produtos são mantidas, semelhantemente ao alimento fresco (SATO, 2009).

A seguir será apresentada a figura 1 que demonstra toda a cadeia produtiva básica dos produtos minimamente processados, na qual estão inseridas as operações a serem realizadas e a temperatura máxima recomendada para cada processo. Cabe ressaltar que este fluxograma pode sofrer variações segundo a especificidade do produto.

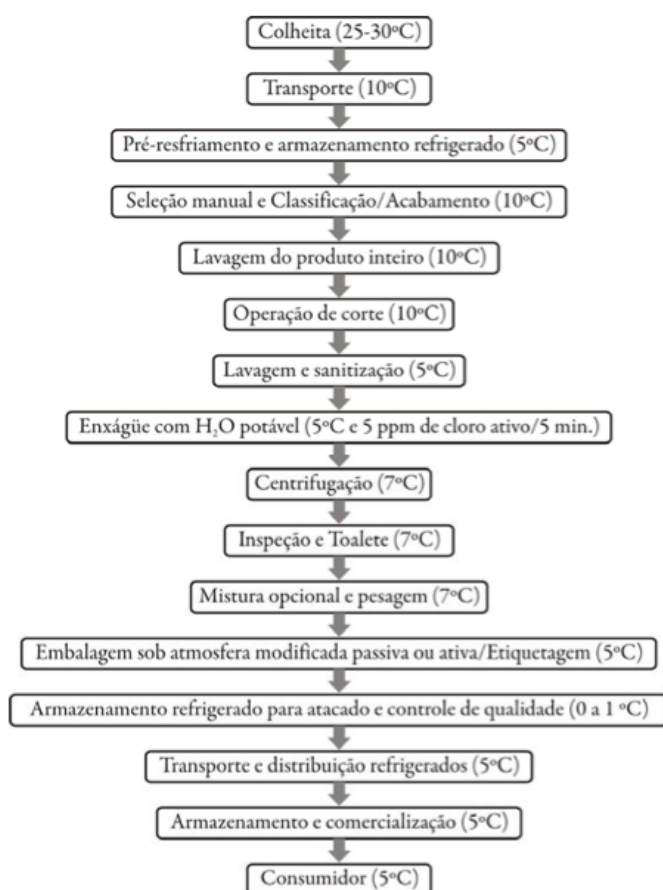


Figura 1. Fluxograma geral descrevendo as operações da cadeia produtiva dos produtos minimamente processados de uma unidade industrial com as temperaturas recomendadas para cada etapa

Fonte: EMBRAPA (2011, p. 20).

Segundo LEITAO (2004) a segurança dos PMP está diretamente ligada ao processo produtivo, desde as operações preliminares até que o mesmo chegue ao consumidor. Dessa forma se percebe a necessidade de uma coordenação competente que vise à qualidade do produto através da monitorização e coordenação do processo produtivo (TOLEDO et al., 2004).

1.3 Processo de produção da couve minimamente processada

Folhas de couve minimamente processadas sem procedimentos rígidos de controle de qualidade apresentam rápida deterioração fisiológica e microbiológica. Os principais problemas que afetam a qualidade da couve minimamente processada durante o armazenamento estão relacionados com a perda da coloração verde, ressecamento, cheiro desagradável, resultando em tempo curto de vida de prateleira (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; NUNES, 2009).

O processamento mínimo de couve foi descrito e padronizado segundo o Manual de Processamento mínimo de Frutas e Hortaliças (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007). Na etapa de pré-processamento é indispensável à obtenção de matéria prima de boa qualidade. Por causa da transpiração, as folhas de couve murcham rapidamente durante a colheita e o transporte até o local de processamento. Para a completa reidratação foliar, as folhas devem passar por um resfriamento rápido ou hidro resfriamento (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; NUNES, 2009).

Na unidade industrial de processamento mínimo a matéria prima deve passar pelas etapas de seleção, classificação e lavagem do produto inteiro. A seleção das folhas visa a não contaminação da área de processamento e a obtenção de um produto final de boa qualidade. Nesta etapa eliminam-se as partes vegetais não processáveis como os talos. As folhas devem ser lavadas em tanques próprios de aço inox com água limpa de qualidade podendo ser água corrente ou por imersão, retirando impurezas e insetos aderidos ao produto. A imersão deve durar cinco minutos e posteriormente as folhas devem ser enxaguadas com água limpa. Nesta etapa retira-se a nervura central com facas afiadas e higienizadas. Após todas essas operações, o produto deve ser colocado em caixas limpas e higienizadas, para serem usadas na área de processamento (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; NUNES, 2009).

A etapa de corte provoca um efeito drástico sobre o metabolismo do produto picado, aumentando a taxa respiratória da folha de couve em

aproximadamente duas vezes, o que pode ser reduzido pelo resfriamento da matéria prima. A partir de testes de aceitabilidade pelo consumidor padronizou-se como referência o fatiamento mecânico com cortes finos de 1,0-1,5 milímetro (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; NUNES, 2009).

A sanitização de couve minimamente processada deve ser realizada por imersão em água resfriada a 5°C, com gelo, contendo 150 ppm de cloro ativo, por aproximadamente dez minutos. Em seguida deve ser enxaguada em água resfriada a 5°C, contendo 3 ppm de cloro ativo, para a retirada do excesso de sanitizante. Para a sanitização e enxágue, que devem ser realizados em tanques de aço inoxidável distintos, o produto deve ser colocado em sacos de náilon ou em caixas de plástico limpas e higienizadas. Nos tanques de sanitização e enxágue os produtos devem ficar completamente imersos. A solução (água + cloro) deve ser trocada pelo menos de quatro a seis vezes ao dia (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; NUNES, 2009).

A baixa temperatura (5°C) durante a sanitização reduz a taxa respiratória do produto em aproximadamente 25% e contribui para a manutenção dos teores de sólidos solúveis e de vitamina C. Assim, o abaixamento da temperatura favorece o processamento contínuo da couve, obtendo um produto com alta qualidade e estendida vida de prateleira (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

Após a etapa de sanitização e enxágue é necessário à retirada do excesso de água por meio de centrifugação por 10 minutos (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; NUNES, 2009).

Na etapa de embalagem, o uso de filmes plásticos que restringem à perda de água devido à sensibilidade a desidratação é de vital importância para a manutenção da qualidade da couve minimamente processada, ainda que sob baixas temperaturas. É aconselhável o uso de filmes plásticos para que a embalagem restrinja a perda de água e ao mesmo tempo permita trocas gasosas de oxigênio e gás carbônico. A permeabilidade elevada da embalagem mantém os teores de clorofila, carotenoides, sólidos solúveis e vitamina C por até dez dias de armazenamento a 5°C, apresentando elevada aceitabilidade sensorial (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; NUNES, 2009).

O armazenamento da couve minimamente processada em condições adequadas de temperatura é essencial para a manutenção da qualidade do produto final. A temperatura de 5°C apresenta a melhor relação custo/benefício para a couve. A temperatura a 10°C reduz em, no mínimo, cinquenta por cento a vida útil do produto, limitando o tempo de comercialização e favorecendo considerável crescimento microbiano (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; NUNES, 2009).

1.4 Qualidade microbiológica dos produtos minimamente processados

A qualidade do alimento segundo GUIMARÃES et al. (2008) é uma “característica multidimensional do alimento, sendo uma combinação de atributos microbiológicos, nutricionais e sensoriais”. A segurança dos alimentos é um item decisivo para que o alimento tenha qualidade, ou seja, um alimento de qualidade é necessariamente seguro. A segurança dos alimentos significa garantir a ausência de perigos químicos, físicos e microbiológicos no alimento destinado ao consumo humano (EMBRAPA, 2011; EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

As frutas e hortaliças são fontes potenciais de contaminantes microbiológicos que podem oferecer riscos à saúde pública se medidas de segurança não forem adotadas em toda a cadeia de produção, pois os mesmos possuem nutrientes necessários para o crescimento de microrganismos. Os fatores relacionados à segurança dos alimentos minimamente processados estão vinculados à matéria prima, à unidade de processamento e ao processo. Em cada etapa, vários pontos devem ser avaliados e monitorados para minimizar os riscos e reduzir ou eliminar os perigos microbiológicos (EMBRAPA, 2011; EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007, MATOS et al., 2009).

A qualidade microbiológica final do vegetal minimamente processado está associada principalmente à qualidade da matéria-prima utilizada no processamento. Na etapa pré-colheita vários fatores podem comprometer a qualidade das frutas e hortaliças, entre os quais se destacam: as práticas agrônômicas, o uso de água contaminada para irrigação, a aplicação

imprópria de esterco para fertilização do solo e a presença de animais domésticos que podem contaminar o ambiente (EMBRAPA, 2011; EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; MATOS et al., 2009).

Após a colheita, o contato humano e mecânico tem maior influência na contaminação microbiológica dos produtos. Frutas e hortaliças podem ser contaminadas por manuseio, por equipamentos e utensílios, por instalações com condições higiênico-sanitárias inadequadas, pela água de lavagem e por meios de transporte (EMBRAPA, 2011; EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007). A qualidade dos alimentos minimamente processados está diretamente relacionada com a metodologia utilizada durante o processo produtivo, incluindo manipulação adequada da matéria prima e controle de temperatura, além do uso de embalagens adequadas para armazenamento (PAULA et al., 2009; SILVA, 2008).

As operações de processamento mínimo não asseguram esterilidade ou estabilidade microbiológica. O manuseio favorece a contaminação por microrganismos, enquanto a liberação de exsudados celulares disponibiliza nutrientes para a atividade microbiana. Segundo SMANIOTO et al. (2009), uma das formas de implementar o controle de qualidade dos alimentos minimamente processados é através da aderência ao programa de Boas Práticas de Fabricação (BPF), responsável por ditar regras e princípios que irão nortear o manuseio dos alimentos desde a recepção da matéria prima até que o produto chegue ao destino final – consumidor.

A adoção das BPF em unidades de processamento mínimo de frutas e hortaliças garante a segurança dos produtos e está relacionada principalmente à higiene e à sanitização. Assim, todos os procedimentos de limpeza antes e após o processamento devem ser estabelecidos para minimizar os riscos microbiológicos e garantir a segurança do produto final (EMBRAPA, 2011; EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007; NASCIMENTO et al., 2007).

Outro risco associado com frutas e hortaliças minimamente processadas é a possibilidade de abuso de temperatura após a embalagem e durante a distribuição, transporte, armazenamento, comercialização, ou antes, de serem consumidas. Quando esse fato ocorre, há um potencial para a proliferação rápida de microrganismos mesofílicos, resultando na

deterioração precoce e consequente redução da vida de prateleira do produto. A proliferação microbiana depende da temperatura e patógenos como *Listeria monocytogenes*, mesófilos aeróbios e bactérias do ácido láctico apresentam taxa de crescimento pronunciado a 12°C, temperatura que ocorre frequentemente em condição de abuso na cadeia de frio (EMBRAPA, 2011; EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

Assim existe a necessidade de manutenção efetiva da cadeia de frio em toda a cadeia de produção das frutas e hortaliças minimamente processadas, inclusive durante a estocagem e distribuição, para prevenir o desenvolvimento microbiano. O controle da temperatura é a técnica mais útil e importante para minimizar as injúrias provocadas pelo processamento mínimo de frutas e hortaliças (EMBRAPA, 2011; EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

A couve minimamente processada normalmente é distribuída e comercializada em pacotes de 250 a 300 gramas, dispostos em balcões refrigerados com temperatura de 1°C a 5°C. A couve na forma minimamente processada é extremamente perecível. A sua comercialização em gôndolas abertas, cujas temperaturas atingem 10°C, aumenta as possibilidades de riscos de doença alimentar, por causa do crescimento de bactérias patogênicas ao homem nessas condições (EMBRAPA, 2011; EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

1.5 Contaminação microbiológica dos produtos minimamente processados

Microrganismos patogênicos e deterioradores podem contaminar os produtos de origem vegetal por fontes diversas. A contaminação inicia-se na fase de produção, nos campos, quando há o contato com solo, água, fezes de animais; continua durante as etapas de colheita, transporte da matéria-prima até a indústria e durante o processamento e finaliza no preparo do produto pelo consumidor (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

Os produtos minimamente processados são mais perecíveis dos que os produtos in natura. Nas frutas e hortaliças intactas, a casca e a integridade

do tecido vegetal constituem uma barreira ao acesso de microrganismos ao interior do produto. A injúria provocada nos tecidos vegetais em função da manipulação, do corte e da remoção da casca, pode favorecer a contaminação por microrganismos deterioradores e patogênicos (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

Os microrganismos deterioradores e patogênicos podem ser mesófilos (temperatura ótima de crescimento entre 20°C e 35°C) ou psicrotóxicos (crescem em temperaturas inferiores a 7°C, mas a temperatura ótima é de 20°C a 30°C). Cabe ressaltar que os microrganismos de maior importância clínica são os mesófilos, pois muitos possuem a capacidade de se multiplicarem no organismo humano devido a sua temperatura ideal de crescimento (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Assim, os PMP podem ser fonte de doenças transmitidas por alimentos, que segundo estudos têm aumentado drasticamente nas últimas décadas (SIVAPALASINGAM et al., 2004; BRANDL, 2006). O consumo de produtos frescos de origem vegetal tem sido associado à transmissão de várias infecções do trato gastrointestinal (ARBOS et al., 2010). Bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae* estão relacionadas com surtos de infecção alimentar em razão do consumo de frutas e hortaliças frescas contaminadas (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

No estudo de SANTOS (2008) foi demonstrada alta contaminação por coliformes termotolerantes em amostras de couve minimamente processada, comercializadas no Distrito Federal. Já no estudo de TRESSELER et al. (2009) foram analisadas amostras de agrião, alface, cenoura ralada, espinafre, repolho verde ralado e rúcula minimamente processados e *Salmonella* sp. foi detectada em 12,7% das amostras.

Ainda segundo estudos realizados por TRESSELER et al. (2009) uma amostra de agrião minimamente processada, após sanitização apresentou-se contaminada por *Salmonella* sp., porém anteriormente a este processo não apresentou a contaminação. Dessa forma os autores concluíram que essa ocorrência pode ser atribuída à contaminação cruzada ocorrida durante o processamento. A contaminação cruzada é definida como a transferência de microrganismos deteriorantes ou patogênicos de um alimento para outro via

uma superfície de contato que não seja o próprio alimento como as mãos, equipamentos ou utensílios. Ela pode ser originada também da transferência direta destes microrganismos de uma matéria-prima (alimento não processado) para um alimento processado (EMBRAPA, 2011).

A contaminação das hortaliças e frutas minimamente processadas afeta adversamente a qualidade e a segurança destes produtos, pois os microrganismos patogênicos que não estariam na microbiota natural passam a estar presentes podendo ocasionar diversos problemas de saúde pública (ROSA et al., 2000). Além disso, cabe ressaltar que os microrganismos naturalmente presentes, quando em concentrações acima das orientadas pela literatura e pela legislação, acabam diminuindo o tempo de prateleira dos alimentos, pois ocasionam a sua rápida deterioração (TRESSELER et al., 2009).

No Brasil, a RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) que estabelece o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos, determina os parâmetros microbiológicos para frutas e hortaliças in natura, porém não caracteriza as frutas e hortaliças minimamente processadas, podendo agravar o problema de contaminação microbiológica nesses produtos, pela falta de regulamentação.

As determinações de coliformes totais e termotolerantes demonstram se as etapas do processo produtivo foram realizadas dentro das condições higiênico-sanitárias adequadas, pois os PMP são para consumo imediato, ou seja, existe a possibilidade de serem ingeridos crus, facilitando assim a contaminação do consumidor, caso o alimento esteja fora das condições adequadas de produção e armazenamento (SILVA, et al., 2007). A principal representante dos coliformes termotolerantes é a bactéria *Escherichia coli* que indica contaminação fecal do alimento (GUZMAN et al., 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que *Escherichia coli* e *Salmonella* sp. estão frequentemente presentes nos surtos de doenças transmitidas por alimentos 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 considerado um agente bacteriano responsável por surtos descritos na literatura, porém, segundo AMSON et al. (2006), muitos não são notificados porque os sintomas geralmente são discretos, tais como diarreia e vômitos. Essa bactéria tem a capacidade de produzir diversos fatores de virulência, como por exemplo, enterotoxinas que são resistentes à ação das enzimas gástricas e estáveis a temperaturas de até 100°C por 30 minutos. Quando contaminado, o indivíduo apresenta rapidamente os sintomas, tais como: vômitos severos, dores abdominais e diarreias intensas (MURRAY, et al., 2006).

1.6 Uso da biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos

As técnicas microbiológicas mais utilizadas são aquelas realizadas em meios de cultura não seletivos e seletivos, juntamente com os testes bioquímicos diferenciais, geralmente de produção enzimática, usados conjuntamente com os testes sorológicos (GANDRA, et al., 2008). Apesar de serem métodos tradicionais de detecção de microrganismos em alimentos com elevada confiabilidade e eficiência, estes são considerados demorados na liberação de seus resultados (MARIN, et al., 2006). Dessa forma surgiram novos métodos de identificação de bactérias, como as técnicas baseadas na amplificação de DNA, que por sua vez, são mais eficientes, versáteis, sensíveis e robustas (ROJAS et al., 2011).

A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) permite amplificar um fragmento de DNA específico presente em um conjunto complexo. A técnica se baseia no uso de enzimas que possuem a função de copiar o

material genético de uma cadeia pré-existente, a qual serve como molde para a nova “fita” de DNA a ser sintetizada (POWLEDGE, 2004; CLARK, et al., 2012).

Para que a PCR ocorra são necessários diversos componentes essenciais, tais como iniciadores (*primers*), enzima DNA polimerase, $MgCl_2$, KCl, Tris – HCl, desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP's), molde de DNA e água estéril (REECE, 2004; PELT-VERKUIL et al., 2008). Sendo que, os iniciadores são fragmentos curtos de DNA que possuem bases nitrogenadas do material genético, adenina, timina, guanina e citosina (POWLEDGE, 2004). A enzima DNA polimerase é a responsável pela síntese da nova cadeia, e devido a sua exposição a elevadas temperaturas, esta enzima deve ser termoestável (CLARK et al., 2012).

Na reação, o magnésio tem a função de aumentar a eficiência e especificidade da enzima, pois os íons Mg^{2+} são cofatores da *taq* polimerase. Já o cloreto de potássio (KCl) auxilia no emparelhamento dos *primers* com a sequência alvo na fita molde, mas em concentrações elevadas reduz a especificidade devido a potencializar o emparelhamento em outros locais. O tampão Tris-HCl é necessário para equilibrar o pH da reação, fazendo-o variar de acordo com a temperatura. Por fim, os desoxirribonucleotídeos trifosfatados são compostos pelos quatro nucleotídeos (desoxiadenina trifosfato, desoxicitosina trifosfato, desoxiguanina trifosfato e desoxitimina trifosfato) que são utilizados na fase de extensão da PCR, ou seja, no momento da criação da cópia do DNA (MCPHERSON et al., 2006).

A técnica de PCR é muito comumente utilizada para a identificação de patógenos virulentos e segundo DOBROWSKY et al. (2014) estes patógenos podem ser identificados através da pequena sub unidade ribossomal (16S) do RNA, pois este gene é considerado um identificador de virulência universal. Os estudos realizados por COENYE et al. (2003) analisaram 55 genomas bacterianos que demonstraram a heterogeneidade intragenômica nos genes 16S rRNA, porém com resultados inferiores ao limiar comum (1–1,3%) para espécies distintas. Outro trabalho realizado por ACINAS et al. (2004), com análises de 76 genomas bacterianos inteiros, demonstrou elevada diversidade dos genes 16S rRNA em *Thermoanaerobacter tengcongensis*.

Segundo SENORANS et. al., (2003) a implantação da PCR nos processos de avaliação da qualidade de alimentos facilita a identificação de contaminantes e possibilita a identificação de patógenos. Porém é necessário ressaltar que alguns contaminantes podem gerar inibição da PCR, devido a isso quando o estudo for baseado nas características moleculares do alimento é necessário que o mesmo seja submetido ao processo de desinfecção adequado.

Essa técnica tem aplicação direta na identificação de patógenos nos alimentos, porém quando se utiliza um elevado número de determinações microbiológicas o custo para a utilização da técnica se torna muito elevado (MARIN, et al., 2006). Além disso, há alguns obstáculos que dificultam a implementação deste método na rotina laboratorial, entre eles: incapacidade de diferenciar entre células mortas e vivas, a presença de inibidores da *taq* polimerase em alguns alimentos, alto investimento em equipamentos e reagentes, e ainda a falta de aprovação e regulamentação por parte dos órgãos competentes (MARLONY et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo realizar as análises microbiológicas em diferentes marcas de couve minimamente processada comercializadas nos supermercados de Brasília.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos microorganismos 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.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos patogênicos.
- Verificar se a couve minimamente processada está adequada para o consumo humano através da comparação dos resultados com a legislação brasileira.

3 JUSTIFICATIVA

As alterações nos hábitos alimentares e preferência do consumidor são fenômenos sociais que produziram forte impacto no agronegócio. Frutas e vegetais frescos cresceram em popularidade em detrimento dos produtos industrializados e, ao mesmo tempo, houve uma crescente procura por produtos de alta qualidade e de fácil preparo. Como resultado, a demanda por frutas e hortaliças minimamente processadas tem evoluído rapidamente. Dentre as hortaliças, a couve é altamente consumida pela população brasileira, viabilizando o seu uso como minimamente processada. Considerando que o Distrito Federal representa um importante mercado consumidor, este trabalho realizou a pesquisa das condições microbiológicas de couves minimamente processada exposta ao consumo em supermercados da cidade de Brasília e assim pode determinar se nessa cidade esse produto está sendo distribuído com qualidade, de forma a garantir a segurança alimentar do consumidor.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e preparo das amostras

Foram coletadas seis diferentes marcas de couve minimamente processada, comercializadas em quatro hipermercados de Brasília no período de três semanas consecutivas entre os meses de Janeiro e Fevereiro de 2014. As coletas das amostras foram realizadas no mesmo dia em que se iniciaram as análises laboratoriais, sendo as mesmas transportadas dos supermercados por tempo máximo de uma hora até o laboratório. As diferentes marcas da couve minimamente processada foram identificadas na ordem de coleta, ou seja, os números variam de 1 ao 6 para que as marcas não sejam reveladas.

Para o preparo das amostras, foram pesadas, asépticamente, 25 g de cada amostra e diluídas em 225 ml de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado por 20 minutos, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição foram realizadas as demais diluições decimais. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

4.2 Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas

Para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias mesófilas e a 7°C \pm 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 10 ml de 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 24-48 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.

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).

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 sp.*

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_2S), 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_2) 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_2S como *Salmonella* (ANVISA, 2010).

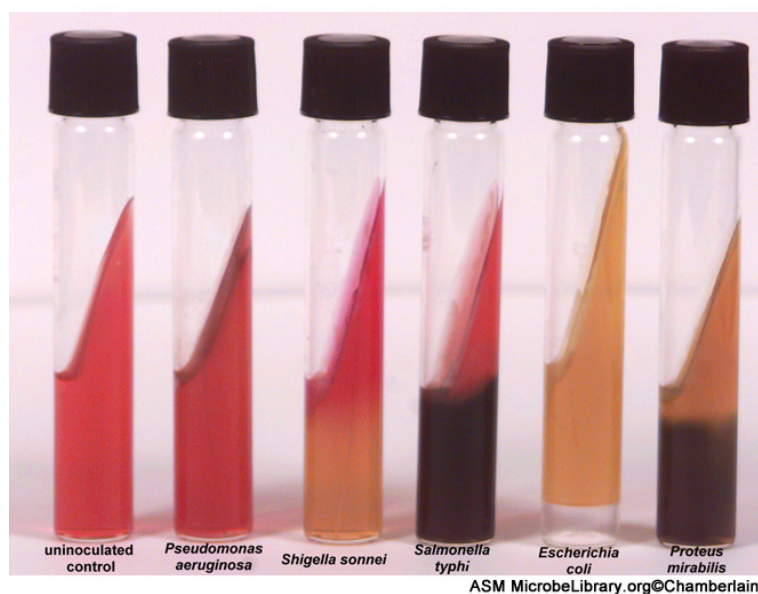


Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).

4.5 Contagem de *Staphylococcus* sp.

Para a contagem de *Staphylococcus* sp., as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar Mueller Hinton suplementado com cloreto de sódio 7% (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

4.6.1 Extração de DNA bacteriano

A extração de DNA bacteriano foi realizada a partir de colônias isoladas dos meios ágar sal-manitol e ágar três açúcares e ferro (TSI), utilizando o kit NucleoSpin Plasmid® (MN). Antes de iniciar a extração, foi feita a preparação das soluções reagentes, materiais e amostras. As

amostras foram representadas pelas colônias isoladas suspeitas de serem bactérias patogênicas, cultivadas em caldo LB por 12 horas. Adicionou-se 1,5 mL de cada amostra em tubo eppendorf, centrifugou-se por 5 minutos e descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o Pellet). Repetiu-se este procedimento por mais três vezes, completando-se o volume de 6 mL. Foram adicionados 250 µL do tampão Resuspension Buffer A1, encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função desfazer os grumos celulares). Após isso, os tubos eppendorfs foram homogeneizados em “vortex”. Na sequência, foram adicionados 250 µL do tampão *Lysis Buffer A2*, homogeneizou-se e deixou descansar por 5 minutos (esta etapa é importante para a lise da parede e membrana celulares, com liberação do conteúdo celular). Passado o tempo de descanso, foi adicionado 300 µL do tampão Neutralization Buffer A3, homogeneizou-se e centrifugou-se por 10 minutos (este tampão tem como função retirar as proteínas que envolvem o DNA e voltar o valor de pH para próximo de 8, impedindo que a solução de lise facilite a quebra das ligações covalentes do ácido nucléico). Em seguida, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica; transferiu-se o sobrenadante para o filtro e centrifugou-se por 5 minutos. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-se 500 µL do tampão AW (previamente colocado em banho-maria à 50°C) e centrifugou-se por 2 minutos. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 600 µL do tampão A4, centrifugou-se por 2 minutos e descartou-se o filtrado (os tampões AW e A4 contém isotiocianato de guanidina, em concentrações crescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e a retirada das outras biomoléculas da amostra). Foi feita outra centrifugação com o tubo vazio. Após isto, o filtro foi trocado para outro eppendorf definitivo, onde foram adicionados 50 µL do tampão Elution Buffer AE (este tampão favorece a eluição do DNA), centrifugou-se por 2 minutos, descartou-se o filtro e as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

4.6.2 *Reação em cadeia da Polimerase (PCR)*

Baseado na sequência para o gene 16S rRNA, em que o oligonucleotídeo Universal iniciador direto/foward (5'-CCAGCAGCCGCCGTAATACG-3') foi desenhado para reconhecer a

sequência universal na posição 1513, enquanto que o iniciador reverso (5'-ATCGGYTACCTTGTTACGACTTC-3') foi reconhecido na posição 1491, foram realizadas as PCR's. As reações de PCR para a detecção deste gene foram realizadas nos seguinte tempos: separação, 94°C por 10 minutos; 30 ciclos utilizados nos passos de desnaturação, anelamento e polimerização com os respectivos comandos: 94°C por 60 segundos, 55°C por 60 segundos e 72°C por 120 segundos. Por último, no processo de extensão, 72°C por 10 minutos.

A PCR do gene 16S rRNA foi realizada utilizando os componentes para o volume da reação de 25 µL, citados na tabela 2. A banda do tamanho do produto de PCR foi de 996 pb, correspondente a região ribossomal, capaz de amplificar todas as espécies destas bactérias.

Tabela 2. Reagentes utilizados para realização da reação de PCR do gene universal

Reagente (quantidade/ concentração do estoque)	Volume
DNA molde 10 ng	4 µL
Tampão Taq 10 x	2,5 µL
MgCl ₂ 50mM	1,25 µL
Mistura dos 4 nucleotídeos- dNTP 2,5 Mm	1,25 µL
Oligo F 10µM	0,5 µL
Oligo R 10µM	0,5 µL
Taq DNA polimerase 5U/µL	0,4 µL
Água Miliq	14,6 µL
Total (em cada ependorff)	25 µL *

* Todos exceto o Controle Negativo (CN).

O termociclador utilizado para os experimentos foi o LifeTouch da BIOER®.

4.6.3 Digestão enzimática

Para realização da digestão, foi utilizada a enzima BshF I (Hae III), EN-1105; tamanho 7000 unidades; concentração 10 unidades/ μL ; fonte *Bacillus sphaericus*, empresa Jena Bioscience. Utilizaram-se os componentes para o volume de 50 μL da reação, citados na Tabela 3.

Tabela 3. Reagentes utilizados para realização da digestão do gene universal

Reagente	Volume
Produto de PCR	10 μL
Enzima BshF I	0,1 μL
Tampão (10x)	5 μL
Água Miliq	34,9 μL
Total (em cada ependorff)	50 μL

- Valores para 1 digestão

Os ependorffs foram colocados por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após isso, fez-se a corrida das amostras em gel de agarose para verificação dos resultados (LU et al., 2000).

4.6.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de extração do DNA, PCR e digestão foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel é de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no começo 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 μL 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 μL de amostra. Para o preparo do gel foi utilizado TBE (Tris- Ácido Bórico), agarose e brometo de etídio (sua função é de corar o gel e permitir a visualização do DNA, quando colocado à luz ultravioleta). Para o oligo Universal Utilizou-se o marcador de 996 pb (pares de bases).

4.6.5 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas no sequenciador automático Perkin Elmer ABI-Modelo 377. Foram utilizados cerca de 200 ng de DNA, 5 nmoles dos oligonucleotídeos apropriados para cada amostra e o kit comercial DyEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing (MJ Research, INC). Posteriormente, a análise de alinhamentos locais foi feita pelo emprego do programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), contra a base de dados do GeneBank.

4.7 Descarte de resíduos

Todos os materiais utilizados nos ensaios foram de uso único e manipulados em câmaras de segurança biológica classe II. Após o uso, foram colocados em solução desinfetante (hipoclorito a 1%), e em seguida, autoclavados a 127°C por 20 min em sacos apropriados para autoclavagem. Após a esterilização, os sacos contendo o material descartável foram colocados em recipientes de coleta para resgate pela empresa responsável pela coleta de materiais biológicos do laboratório. Todos os procedimentos seguiram a normativa RDC-ANVISA 306/2004 sobre o descarte de resíduos de serviços de saúde.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta das amostras da couve minimamente processada

Para a realização do presente estudo foram coletadas seis diferentes marcas da couve minimamente processada, sendo que as análises de cada marca foram realizadas em triplicata para que os resultados fossem expressos como média. A coleta se deu em quatro diferentes supermercados localizados em Brasília no período de três semanas consecutivas entre os meses de Janeiro e Fevereiro de 2014. As diferentes marcas da couve minimamente processada foram identificadas na ordem de coleta, ou seja, os números variam de 1 ao 6 para que as marcas não sejam reveladas.

5.2 Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas

Segundo a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimento – ICMSF (2014), o indicador microbiológico mais comumente utilizado para certificar a qualidade dos alimentos é o número de microrganismos aeróbios mesófilos encontrados nos mesmos, pois este indica se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados adequadamente.

Ao se analisar os resultados da contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de couve minimamente processada, observou-se que houve um grande crescimento de colônias nas diluições de 10^{-1} e 10^{-2} , o qual impossibilitou a contagem das mesmas, dessa forma as diluições escolhidas para contagem foram de 10^{-3} ou 10^{-4} . A tabela 4 mostra os resultados da contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de couve minimamente processada, que foram expressos como média de UFC/g e log de UFC/g com o desvio padrão.

Tabela 4. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de couve minimamente processada

Amostras de couve	Bactérias mesófilas		Bactérias psicrotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 1	1,3x10 ⁷	7,11 ± 0,13	6,4x10 ⁷	7,80 ± 0,07
Amostra 2	1,4x10 ⁷	7,10 ± 0,22	1,7x10 ⁷	7,20 ± 0,29
Amostra 3	7,2x10 ⁶	6,82 ± 0,25	1,4x10 ⁶	6,15 ± 0,44
Amostra 4	8,4x10 ⁶	6,84 ± 0,33	1,5x10 ⁷	7,17 ± 0,06
Amostra 5	3,5x10 ⁷	7,32 ± 0,68	7,0x10 ⁷	7,84 ± 0,09
Amostra 6	1,2x10 ⁷	7,07 ± 0,09	3,8x10 ⁶	6,58 ± 0,06

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata
DP = desvio padrão

Ao se analisar os dados obtidos neste trabalho observou-se que houve uma alta contagem de bactérias mesófilas (7,2x10⁶ a 3,5x10⁷ UFC/g) e também de bactérias psicrotróficas (1,4x10⁶ a 7,0x10⁷ UFC/g) nas amostras de couve minimamente processada.

Apesar da legislação brasileira não estabelecer limites para a contagem total de microrganismos aeróbios nos alimentos, sabe-se que os dados obtidos estão integralmente relacionados com a contaminação da matéria prima durante as etapas do processamento ou com a alta carga microbiana inicial (AYÇYÇEK, 2004).

De acordo com SILVA et al. (2006), a contagem aceitável de mesófilos aeróbios em vegetais frescos é de 1,0x10⁵ UFC/g. Pelos padrões estabelecidos pelo ICMSF (2014) permite-se uma contagem máxima de 1,0 x10⁷ UFC/g de microrganismos aeróbios totais para os alimentos em geral.

No trabalho de SILVA et al. (2007), que analisou amostras de vegetais minimamente processados, os valores obtidos para a contagem de bactérias mesófilas também foram altos (4,7x10⁵ a 1,6x10⁸ UFC/g), assim como, os valores obtidos para a contagem de bactérias psicrotróficas (7,9x10⁶ a 2,7x10⁸ UFC/g).

Segundo JAY (2005) as contagens de microrganismos aeróbios em vegetais minimamente processados, em geral, variam de 10⁶ a 10⁷ UFC/g.

Segundo o ICMSF (2014) a lavagem comercial dos vegetais frescos pode remover 90% da microbiota superficial, o que significa que 10^5 UFC/g irão permanecer após a lavagem. De acordo com SILVA et al. (2006), essa contagem pode ter variações amplas e não fornece dados em relação aos critérios para aceitabilidade do produto, mas pode ser útil para as indústrias de processamento rastrear os fatores que podem influenciar a contagem.

Na literatura há estudos que comprovam que após o corte e preparação dos vegetais minimamente processados há um aumento considerável na contagem de bactérias, variando de 10^5 a 10^{10} UFC/g (GLEESON et. al., 2005). O tempo de armazenamento também favorece o crescimento da população microbiana. No trabalho realizado por ALLENDE et. al., (2004), os produtos minimamente processados tiveram um aumento de $1,0 \times 10^5$ para $1,0 \times 10^8$ UFC/g dos após sete dias de estocagem na temperatura de 5°C.

Se os vegetais retem grande parte da sua microbiota original depois do processamento, isso pode representar um problema de saúde pública, porque à medida que a população desses microrganismos aumenta, incrementa-se também a possibilidade de existirem microrganismos patogênicos e a presença de toxinas resultantes do metabolismo microbiano (APHA, 2001).

Os vegetais minimamente processados devem ser armazenados em temperaturas adequadas de refrigeração a fim de inibir o crescimento de bactérias psicrófilas (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007). Os microrganismos aeróbios psicrófilos em número elevado são responsáveis pela diminuição da vida de prateleira dos alimentos refrigerados, por constituírem seus principais deterioradores (APHA, 2001).

5.3 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes (*E. coli*)

Os coliformes totais, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, são todos os bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, oxidase-negativos, capazes de crescer na presença de sais biliares, com propriedades similares de inibição e de crescimento, e que, produzem ácidos

e gás a 35°C, em até 48 horas, a partir da fermentação da lactose. A contagem de coliformes totais permite averiguar possíveis contaminações pós-sanitização ou pós-processo. Altas contagens de coliformes totais indicam falhas higiênicas ao longo do processamento e possibilidade da presença de microrganismos patogênicos entéricos (FRANCO & LANDGRAF, 2008, SANTOS, 2008).

Os coliformes termotolerantes são um subgrupo dos coliformes totais capazes de fermentar a lactose com produção de gás quando incubados em temperatura mais elevada, entre 44,5 e 45,5°C por até 48 horas. Nessas condições 90% dos coliformes são *Escherichia coli*. O grupo dos coliformes termotolerantes atua como indicador de poluição fecal, devido à sua ocorrência restrita às fezes do ser humano e dos animais homeotérmicos. Sua presença evidencia o risco da presença de organismos patogênicos de origem fecal (FRANCO & LANDGRAF, 2008; SILVA, et. al., 2007).

Neste trabalho foram analisadas 6 diferentes marcas de couve minimamente processada, sendo que 5 amostras, ou seja, 83,33% das amostras apresentaram elevada enumeração de coliformes totais com resultados superiores a $1,0 \times 10^3$ NMP/g, indicando condições higiênicas inapropriadas e/ou processamento deficiente. Os resultados das análises dos coliformes totais e termotolerantes estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de couve minimamente processada

Amostras de couve	Coliformes totais		Coliformes termotolerantes	
	NMP/g	Log NMP/g \pm DP	NMP/g	Log NMP/g \pm DP
Amostra 1	$>1,0 \times 10^3$	3,04 \pm 0,00	$0,8 \times 10^1$	0,91 \pm 0,07
Amostra 2	$>1,0 \times 10^3$	3,04 \pm 0,00	$1,5 \times 10^2$	2,17 \pm 0,00
Amostra 3	$>1,0 \times 10^3$	3,04 \pm 0,00	$1,2 \times 10^2$	2,08 \pm 0,60
Amostra 4	$3,1 \times 10^1$	1,50 \pm 0,09	$<0,3 \times 10^1$	0,48 \pm 0,00
Amostra 5	$>1,0 \times 10^3$	3,04 \pm 0,00	$>1,0 \times 10^3$	3,04 \pm 0,00
Amostra 6	$>1,0 \times 10^3$	3,04 \pm 0,00	$5,9 \times 10^1$	1,77 \pm 0,17

Os resultados foram expressos como média de medidas em duplicata
DP = desvio padrão

Os resultados da enumeração de coliformes termotolerantes deste estudo mostraram que das 6 diferentes marcas de couve minimamente processada, 3 amostras, ou seja, 50% das amostras apresentaram elevada enumeração de coliformes totais com resultados superiores a $1,0 \times 10^2$ NMP/g, indicando contaminação fecal. De acordo com a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2001) essas amostras estavam impróprias para o consumo humano. O limite máximo aceitável para a enumeração de coliformes termotolerantes em vegetais frescos é de $1,0 \times 10^2$ NMP/g.

No estudo de SILVA et al. (2007), 90% das amostras analisadas de vegetais minimamente processados apresentaram elevada enumeração de coliformes totais com resultados superiores a $2,4 \times 10^4$ NMP/g. Já a enumeração de coliformes termotolerantes variou de $<0,3 \times 10^1$ a $1,1 \times 10^4$ MPN/g, sendo que 14,3% das amostras foram consideradas impróprias para o consumo por excederem o limite aceitável para a enumeração de coliformes termotolerantes.

Os resultados obtidos neste estudo foram similares aos de SANTOS (2008), que analisou amostras de uma única marca de couve minimamente processada coletada em diferentes supermercados de Brasília, sendo que 43% das amostras foram consideradas impróprias para o consumo por excederem o limite aceitável para a enumeração de coliformes termotolerantes. Cabe ressaltar que neste estudo, o aumento da enumeração de coliformes termotolerantes se deu nas etapas que se seguiram fora da agroindústria, indicando falhas na manutenção da cadeia do frio. O armazenamento da couve minimamente processada na temperatura de 5°C é essencial para a manutenção da qualidade do produto final (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2007).

5.4 Determinação da presença de *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos gram-negativos e bioquimicamente são em geral lactose e sacarose negativos, mas fermentam a glicose com produção de gás (FRANCO & LANDGRAF, 2008). O gênero *Salmonella* é de ampla importância clínica,

pois possui a capacidade de se adaptar a condições ambientais extremas, podendo ocasionar surtos relacionados a alimentos. Esse microrganismo é capaz de desencadear diversas doenças nos seres humanos, como por exemplo, febre tifoide, febres entéricas, enterocolites e artrite reativa (D'AOUST, 2007).

Segundo estudos realizados por D'AOUST (2007), os surtos de salmonelose através do consumo de frutas e hortaliças são derivados da utilização, principalmente, dos fertilizantes não compostados ou parcialmente compostados. Águas contaminadas para irrigação e exposição do alimento a animais silvestres infectados também podem ser fontes de contaminação. O principal habitat das salmonelas é o trato intestinal de aves, répteis e seres humanos. Geralmente, os alimentos são contaminados pelo contato com águas poluídas e direta ou indiretamente pelas fezes dos animais (GUIMARÃES et al., 2001; FRANCO & LANDGRAF, 2008). Devido a importância clínica deste microrganismo para a saúde pública, a legislação brasileira (BRASIL, 2001) determina que o gênero *Salmonella* sp. esteja ausente em 25 g da amostra.

Neste trabalho, através das técnicas laboratoriais baseadas na diferenciação e isolamento de microrganismos com o uso de meios de cultura, não houve detecção de bactérias suspeitas de serem *Salmonella* sp. nas amostras de couve. Porém, na análise molecular foi possível detectar *Salmonella enterica* subsp. *enterica* na amostra 3, que de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001) estava imprópria para o consumo.

Segundo ELIZAQUIVEL & AZNAR (2008), os testes moleculares tem sensibilidade mais elevada que os testes microbiológicos e são capazes de detectar concentrações mínimas de microrganismos em amostras de alimentos (10^3 UFC/g). O resultado encontrado neste trabalho é divergente do estudo realizado por SANTOS (2008), no qual não houve detecção de *Salmonella* sp. nas amostras de couve minimamente processadas. Porém corrobora com a pesquisa realizada por TRESSELER (2009), onde houve contaminação por *Salmonella* sp. em 12,7% das amostras de hortaliças analisadas. Segundo TRESSELER (2009) a presença de *Salmonella* sp. nas amostras foi devido a um processo de sanitização deficiente e também por contaminação cruzada.

5.5 Contagem de *Staphylococcus* sp.

Para a contagem de *Staphylococcus* sp., as amostras foram semeadas em meio de cultivo ágar Mueller Hinton suplementado com cloreto de sódio 7% (p/v) e incubadas a 37°C por 48 h. Após incubação, as colônias isoladas foram semeadas em ágar Sal Manitol e incubadas a 37°C por 48 h. As colônias fermentadoras de manitol foram coradas pelo método de Gram e observou-se que havia predominância de bactérias na forma de cocos gram positivos e de bactérias na forma de bacilos gram positivos.

Após a coloração de gram, as contagens das colônias foram refeitas para subtrair as colônias marcadas como não *Staphylococcus* sp. A Tabela 6 apresenta o resultado da contagem das colônias fermentadoras do manitol e o resultado estimado da contagem de *Staphylococcus* sp., após a coloração de gram.

Tabela 6. Contagem das colônias fermentadoras de manitol e contagem estimada de *Staphylococcus* sp., após coloração de gram

Amostras de couve	Agar Sal Manitol (Total de colônias)		Coloração de gram (<i>Staphylococcus</i> sp.)
	UFC/g	Log UFC/g ± DP	UFC/g
Amostra 1	8,2x10 ³	3,78 ± 0,48	1,1x10 ³
Amostra 2	9,3x10 ⁴	4,47 ± 0,10	1,5x10 ⁴
Amostra 3	6,0x10 ²	2,78 ± 0,21	6,0x10 ²
Amostra 4	9,9x10 ³	3,99 ± 0,06	9,9x10 ³
Amostra 5	3,6x10 ⁵	5,40 ± 0,54	**
Amostra 6	1,4x10 ⁵	5,14 ± 0,14	9,8x10 ⁴

** predomínio de bacilos gram positivos

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata
DP = desvio padrão

Neste trabalho foram analisadas 6 diferentes marcas de couve minimamente processada, sendo que 5 amostras, ou seja, 83,33% das amostras apresentaram contaminação com *Staphylococcus* sp. No estudo

posterior de biologia molecular, algumas amostras foram testadas e foram geneticamente confirmadas como *S. aureus*.

Os resultados deste estudo mostraram que 4 marcas de couve minimamente processada, ou seja, 66,67% das amostras apresentaram elevada contagem de *S. aureus* com resultados superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/g. De acordo com a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2001) essas amostras estavam impróprias para o consumo humano. O limite máximo aceitável para a contagem de *Staphylococcus aureus* para hortaliças, legumes e similares refrigerados é de $1,0 \times 10^3$ UFC/g (BRASIL, 2001). A contagem de *S. aureus* em valores próximos a 10^5 UFC/g indica risco epidemiológico, porque esse é o número compatível com o início da produção de enterotoxina, se a linhagem em questão for capaz de produzi-la (SORIANO et al., 2002).

A contagem de *Staphylococcus aureus* em números superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/g, normalmente, indica condições higiênicas inapropriadas e/ou processamento deficiente, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada (SORIANO et al., 2002). Uma revisão realizada por LOIR et. al. (2003), demonstrou que há várias décadas diversos surtos alimentares causados por *Staphylococcus aureus* vem sendo descritos na literatura. Em 1985 houve um surto de intoxicação em Kentucky, Estados Unidos, onde uma indústria que produzia leite com chocolate armazenou o produto contaminado com *Staphylococcus spp.* em alta temperatura por 5 horas antes da pasteurização. Desta forma houve a produção de enterotoxinas estafilocócicas neste leite, que depois de comercializado, causou um surto de grande escala.

Na Alemanha foram analisadas cepas isoladas de *Staphylococcus spp.* no leite de vacas com mastite e foi observado que 72,8% das cepas eram produtoras de enterotoxinas. A partir deste estudo é possível perceber a elevada capacidade de intoxicação por *Staphylococcus spp.* quando presente em alimentos não processados adequadamente. Cabe ressaltar que na literatura também há relatos de surtos relacionados à contaminação de vegetais por este microrganismo. Nos Estados Unidos 12,3% dos surtos alimentares causados por este patógeno eram originados do consumo de saladas (LOIR et.al., 2003).

5.6 Detecção de bacilos gram positivos fermentadores de manitol

Neste trabalho foi detectada uma alta contagem de bacilos gram positivos fermentadores de manitol em 4 marcas de couve minimamente processada, ou seja, em 66,67% das amostras (Tabela 7).

Tabela 7. Contagem das colônias fermentadoras de manitol e contagem estimada de bacilos gram positivos, após coloração de gram

Amostras de couve	Agar Sal Manitol	Coloração de gram
	(Total de colônias)	(bacilos gram positivos)
	UFC/g	UFC/g
Amostra 1	$8,2 \times 10^3$	$7,2 \times 10^3$
Amostra 2	$9,3 \times 10^4$	$7,8 \times 10^3$
Amostra 3	$6,0 \times 10^2$	**
Amostra 4	$9,9 \times 10^3$	**
Amostra 5	$3,6 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$
Amostra 6	$1,4 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$

** predomínio de cocos gram positivos

Esporos de bactérias transmitidos pelo solo como os anaeróbios do gênero *Clostridium* (bacilos gram positivos) e os aeróbios do gênero *Bacillus* (bacilos gram positivos) estão frequentemente presentes em vegetais frescos pós-colheita (ICMSF, 2014). Alguns desses microrganismos presentes no solo são patogênicos e podem causar doenças de origem alimentar como *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* (HEYNDRICKX, 2011). Ocasionalmente *B. subtilis* e *B. licheniformis* tem sido implicados em doenças de origem alimentar (BROWN, 2000; NĚMEČKOVÁ et al., 2011). Os outros microrganismos formadores de esporos quando presentes em grande quantidade são deterioradores e provocam diminuição da vida de prateleira, mudanças de textura e cheiro desagradável (HEYNDRICKX, 2011).

Enquanto os vegetais frescos não têm sido associados com surtos de origem alimentar, os PMP armazenados sob refrigeração para sua preservação, têm tido uma associação crescente com surtos de origem alimentar causados principalmente por *B. cereus* ou *Bacillus* sp. que são

bactérias psicotróficas (HEYNDRICKX, 2011). As bactérias do gênero *Bacillus* conseguem se desenvolver em meios contendo sal, sendo que *B. subtilis* e *B. licheniformis* são espécies fermentadoras de manitol, enquanto que *B. cereus* não é fermentador de manitol (BARON, 1996; NĚMEČKOVÁ et al., 2011). Algumas espécies de *Clostridium* são fermentadoras de manitol. O patogênico *C. perfringens* não é fermentador de manitol e tem crescimento inibido em concentrações de sal acima de 6,5% (DUERRE, 2005; MIAH et al., 2011; VOS et al., 2011).

Sendo assim, no presente estudo, as principais bactérias patogênicas não fermentadoras de manitol (*Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*) associadas às doenças de origem alimentar não foram detectadas nas amostras de couve minimamente processada. Porém a alta contagem de bacilos gram positivos fermentadores de manitol indica a presença de deterioradores e a possível redução de vida de prateleira do produto.

5.7 Análises moleculares

5.7.1 Perfil de restrição para a região gênica 16S rRNA

O primer universal amplificou o gene 16S rRNA, neste estudo, de várias amostras, que desenvolveram bandas de amplificação na altura de 996 pb. Segundo Lu et al (2000) a digestão com a enzima HaeIII destes amplicons de 16S rRNA resultaria em bandas com perfis entre 150 a 200 pb. No gel abaixo é possível evidenciar que este perfil ocorreu, com o predomínio de bandas na altura de 200 pb.

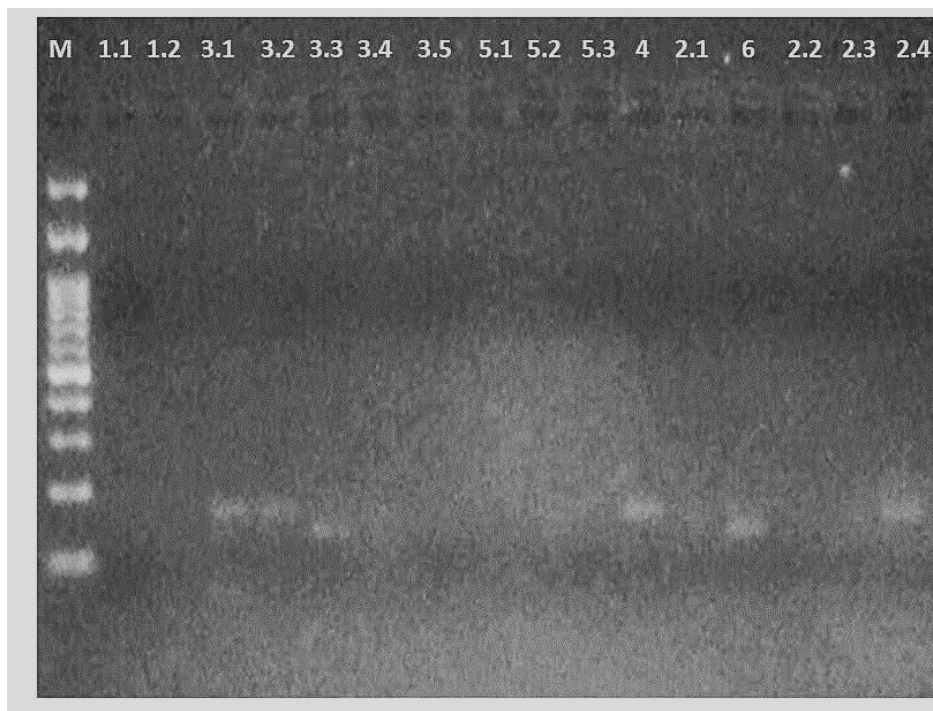


Figura 3. Gel de agarose da digestão do amplicon do gene 16S rRNA das amostras com a enzima HaeIII, evidenciando diversos fragmentos próximos a 200 pb. Marcador = Marcador de 100pb. Nos poços seguintes, o primeiro número indica a amostra (de 1 a 6) e a numeração subsequente significa a réplica

5.7.2 Sequenciamento das amostras.

Os resultados do sequenciamento de cada amostra do gel na seção anterior estão descritos na Tabela 8, com o resultado do cruzamento do banco de dados no Anexo 1.

Tabela 8. Identificação através do sequenciamento gênico de algumas bactérias isoladas das amostras de couve minimamente processada

Amostra de couve	Colônia de bactéria isolada	Espécie
1	1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>
	1.2	<i>Listeria monocytogenes</i>
2	2.1	<i>Listeria monocytogenes</i>
	2.2	<i>Clostridium botulinum</i>
	2.3	<i>Listeria monocytogenes</i>
3	3.1	<i>Enterococcus faecalis</i>
	3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	3.3	<i>Escherichia coli</i> O157:H7
	3.4	<i>Staphylococcus aureus</i>
	3.5	<i>Salmonella enterica</i>
4	4	<i>Staphylococcus aureus</i>
5	5.1	<i>Listeria monocytogenes</i>
	5.2	<i>Listeria monocytogenes</i>
	5.3	<i>Listeria monocytogenes</i>
6	6	<i>Escherichia coli</i> O157:H7

Verificou-se a presença de *Listeria monocytogenes* em várias amostras de couve analisadas (1, 2 e 5). A *Listeria monocytogenes* é um patógeno importante nas doenças de origem alimentar, porém sua análise em vegetais não é exigida na legislação brasileira (BRASIL, 2001). A manutenção da temperatura baixa durante a distribuição, transporte e comercialização é o principal problema associado a frutas e hortaliças minimamente processadas. O abuso de temperatura pode dar condição e tempo para a multiplicação de patógenos psicrótrópicos como *Listeria monocytogenes* (BRANDÃO et al.; 2013; COSTA et al., 2009).

L. monocytogenes é uma bactéria patogênica que pode causar graves doenças sistêmicas em humanos, tais como septicemia, meningite e infecção no sistema nervoso central. A taxa de mortalidade é alta em indivíduos susceptíveis, como mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e pessoas

imunodeprimidas e pode alcançar de 20 a 30%. A prevalência de *L. monocytogenes* em alimentos minimamente processados e a alta taxa de mortalidade por listeriose nos grupos de risco fazem dessa bactéria um problema a ser considerado na avaliação dos riscos microbiológicos em alimentos refrigerados prontos para consumo (BRANDÃO et al.; 2013; COSTA et al., 2009).

Na amostra de couve 3, que já tinha sido desaprovada para consumo pelo excesso de coliformes termotolerantes, foi detectado 2 importantes patógenos nas doenças de origem alimentar: *Salmonella* entérica e *Escherichia coli* O157:H7. *Escherichia coli* O157:H7 é um sorotipo muito estudado nos Estados Unidos. Sua transmissão dá através dos alimentos contaminados, principalmente em produtos de origem animal como carne crua ou mal cozida e leite cru, mas pode também ser disseminada através de água não clorada. O principal reservatório é o trato gastrintestinal de bovinos e a bactéria se encontra nas fezes dos bovinos. Um número crescente de surtos está associado com o consumo de vegetais (couve, espinafre, alface, repolho), em que a contaminação ocorreu devido ao contato com fezes de animais, em algum momento durante o cultivo ou manipulação (DELAQUIS et al., 2007; WHO, 2011).

Esse sorotipo de *E.coli* é extremamente virulento, necessitando menos de 100 células para infecção e tem seu principal fator de virulência na produção da verotoxina ou toxina tipo Shiga. Na maioria dos casos, a doença é auto-limitada, mas estima-se que em até 10% dos casos, essa enterite pode ser complicada pela síndrome uremica hemolítica, caracterizada por anemia hemolítica e insuficiência renal aguda, com taxa de mortalidade de 3-5%, especialmente em crianças pequenas e idosos. No geral, a síndrome uremica hemolítica é a causa mais comum de insuficiência renal aguda em crianças pequenas. Ela pode causar complicações neurológicas (como convulsões, acidente vascular cerebral e coma) em 25% dos pacientes e sequela renal, geralmente leve, em torno de 50% dos sobreviventes (SODERSTROM, 2008; WHO, 2011).

A ocorrência de patógenos como *Salmonella* entérica e *Escherichia coli* O157:H7 e *Listeria monocytogenes* nas amostras de couve minimamente

processada pode ser considerada preocupante pela possível ocorrência de surtos.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, todas as 6 diferentes marcas de couve minimamente processada, comercializadas nos supermercados de Brasília, ou seja, 100% das amostras estavam inadequadas para o consumo humano, pois não atenderam aos padrões de qualidade microbiológica exigidos pela legislação brasileira.

As amostras de couve 2, 3 e 5 apresentaram excesso de coliformes termotolerantes, que indica contaminação fecal do produto. Na amostra 3, as análises moleculares detectaram patógenos entéricos importantes em doenças de origem alimentar como *Salmonella* entérica e *Escherichia coli* O157:H7.

As amostras de couve 1, 2, 4 e 6 apresentaram elevada contagem de *S. aureus*, uma bactéria relacionada com falta de higiene durante a manipulação. Nos testes moleculares, várias amostras (1, 2 e 5) apresentaram a bactéria patogênica *Listeria monocytogenes*, que se multiplica nos alimentos refrigerados quando ocorre abuso da cadeia do frio, essencial na correta manutenção desses produtos. Também foi detectada uma alta contagem de bacilos gram positivos fermentadores de manitol em algumas amostras de couve, o que indica a presença elevada de deterioradores e redução de vida de prateleira do produto.

A couve minimamente processada exposta ao consumo nos supermercados da cidade de Brasília está sendo distribuída com falta de qualidade microbiológica e seu consumo representa risco a saúde pública, sem garantia de segurança alimentar ao consumidor.

7 REFERÊNCIAS

ACINAS, S. G., MARCELINO, A., KLEPAC-CERAJ, V., POLZ, M. F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple operons. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 9, p. 2629-2635, 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.

ALLENDE, A., TOMÁS-BARBERÁN, F. A., GIL, M. I. Minimal processing for healthy traditional foods. **Trend Food Science and Technology**, v. 17, n. 9, p. 513-519, 2006.

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

AMERICAN INSTITUTE OF CANCER RESEARCH. Healthy and Wise - A guide to the simple lifestyle steps that can help minimise your and your loved ones risk of cancer. Disponível em: <http://www.aicr.org.uk/Docs/HealthyWise.pdf>2006. Acessado em: 12 de junho de 2014.

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.

ARBOS, K. A. et al., Avaliação microbiológica de alface e água de irrigação das hortas do projeto verde – SESC/MS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 24, n. 186/7, p. 69- 74, 2010.

AYÇYÇEK, H.; SARIMEHMETOGLU, B.; ÇAKIROGLU, S. Assessment of microbiological quality of meals sampled at the meal serving units of a military hospital in Ankara, Turkey. **Food Control**, Guildford, n.15, p. 379-384, 2004.

BARON, S. *Bacillus*. In: Medical Microbiology, 4° edição, Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

BRANDÃO, M. L. et al. *Listeria monocytogenes* em hortaliças: isolamento e sorotipagem, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 1, p. 116-121, 2013.

BRANDL, M.T. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. **Annual Review of Phytopathology**, n.44, p.367–392, 2006.

BRASIL, Ministério da Integração Nacional. In: Simposium Estado actual del mercado de frutos y vegetales cortados en iberoamérica. proyecto XI 22. 2004, San José, Costa Rica. Anais eletrônicos... San José, Costa Rica. Abril, 2004. p. 87-99. Disponível em: <<http://www.integracao.gov.br/>>. Acesso em: 19 de março de 2014.

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.

BROWN, K. L. Control of bacterial spores. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 158-171, 2000.

CLARK, D. P., PAZDERNIK, N. J. Molecular Biology, 2° edição, **Elsevier**, 2012. Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=Mhs-P94d1R8C&hl=pt-PT>. Acesso em: 05 de abril de 2014.

COENYE, T., VANDAMME, P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, p. 45-49, 2003.

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.

COSTA, W. A.; VANETTI, M. C. D.; PUSCHAMANN, R. Biocontrole de *Listeria monocytogenes* por *Pediococcus acidilactici* em couve minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 785-792. 2009.

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

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.

DOBROWSKY, P. H., DEVENTER, A., KWAADSTENIET M. De., NDLOVU, T., et al. Prevalence of virulence genes associated with pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from domestically harvested Rainwater during low and a high-rainfall periods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5 p. 1633 – 1638, 2014.

DUERRE, P. **Handbook on Clostridia**, CRC Press, 920 p., 2005.

ELIZAQUIVEL, P.; AZNAR, R. A multiplex RTi-PCR reaction for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* on fresh, minimally processed vegetables. **Food Microbiology**, v. 25 p. 705-713, 2008.

EMBRAPA. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**, Brasília, DF, 521 p., 2007.

EMBRAPA. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças: tecnologia, qualidade e sistemas de embalagem**. Rio de Janeiro, RJ, 144 p., 2011.

EVANGELISTA, R. M.; VIEITES, R. L.; CASTRO, P. S.; RALL, V. L. M. Qualidade de couve-chinesa minimamente processada e tratada com diferentes produtos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.2, p. 324-332, 2009.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. Bacteriological Analytical Manual - Chapter 4: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria, 2002. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>, Acesso em 25 de setembro de 2014.

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.

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.

GUIMARÃES, K. A. S.; ANDRADE, A. S. Contaminação de produtos lácteos por *Staphylococcus aureus*: Revisão Bibliográfica. **Revista Higiene Alimentar**, v. 22, n. 163, 2008.

GUIMARÃES, A. G.; LEITE, C. C.; TEXEIRA, L. D. S.; SANTANNA, M. E. B.; ASSIS, P. N. Detecção de *Salmonella* spp. em pacientes e manipuladores envolvidos em um surto de infecção alimentar. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 2, n. 12, p. 1-4, 2001.

GUZMÁN, M. C.; BISTONI, M. A.; TAMAGNINI, L. M.; GONZÁLEZ, R. D. Recovery of *Escherichia coli* in fresh water fish, *Jenynsia multidentata* and *Bryconamericus iheringi*. **Water Research**, v. 38, p. 2368–2374, 2004.

HEYNDRIKX, M. The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing, **Applied and Environmental Soil Science**, p. 1-11, 2011.

ICMSF - Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos. Disponível em: < <http://www.icmsf.org/>>. Acessado em 26 de agosto de 2014.

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

JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. **Editora Artmed**, Porto Alegre, 6ª edição. V. 712 p., 2005.

LEITÃO, M. F. F. Perigos em Produtos Agrícolas Frescos. In: Elementos e apoio para as boas práticas agrícolas e o sistema APPCC. Brasília, 200p. (Série qualidade e segurança dos alimentos) Convênio: CNI/SENAI/SEBRAE/EMBRAPA, 2004.

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

LU, J. J.; CHERNG-LIH, P.; SHIH-YI, L.; CHIH-CHIENG, W. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2076-2080, 2000.

MALORNY B., TASSIOS P.T., RÅDSTRÖM P., COOK N., WAGNER M., HOORFAR J. Standardization of diagnostic PCR for detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 83, n. 1, p. 39-48, 2003.

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.

MATTOS, L. M et al. Produção segura e rastreabilidade de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 408-413, 2009.

MCPHERSON, M. J., MOLLER, S. G. PCR: The Basics, 2° edição, Cornwall: Taylor & Francis, 2006. Disponível em: http://books.google.pt/books?id=NSSFjn2SuUC&hl=ptPT&authuser=0&source=gbs_navlinks_s. Acesso em: 20 de Maio de 2014.

MIAH, M. S.; ASADUZZAMAN, M.; SUFIAN, M. A.; HOSSAIN, M. M. Isolation of *Clostridium perfringens*, causal agents of necrotic enteritis in chickens, **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 9, n.1, p. 97–102, 2011.

MURRAY, P. R ; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 5° edição, p. 217-224, 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, 2014.

NASCIMENTO, G. A.; BARBOSA, J. S., BPF – Boas Práticas de Fabricação: uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21 n. 148, p. 24-30, 2007.

NĚMEČKOVÁ, I.; SOLICHOVÁ, K.; ROUBAL, P.; UHROVÁ, B.; ŠVIRÁKOVÁ, E. Methods for detection of *Bacillus* sp., *B. cereus* and *B. licheniformis* in raw milk, **Czech Journal of Food Science**, v. 29, p.55-60, 2011.

NUNES, T. C. F. Avaliação dos efeitos da radiação gama em vegetais da espécie *Brassica oleracea* minimamente processados. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado) – USP - Universidade de São Paulo, 2009.

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, 2009.

PELT-VERKUIL, E. VAN, BELKUM, A. VAN, HAYS, J. P. - **Principles and Technical Aspects of PCR Amplification**. 1° edição, Springer, 2008. Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=-AMuhy2Nwb0C&lr=&hl=pt-PT>. Acesso em: 20 de Maio de 2014.

POWLEDGE, T. M. The polymerase chain reaction. **Advances in Physiology Education**. v. 28, p. 44-50, 2004.

REECE, R. J. Analysis of Genes and Genomes. John Wiley & Sons, 2004. Disponível em: <http://books.google.pt/books?id=oEkBS77TuFcC&lr=&hl=pt-PT>. Acesso em: 20 de maio de 2014.

ROJAS, M. et al. Mitochondrial and nuclear markers for the authentication of partridge meat and the specific identification of red-legged partridge meat products by polymerase chain reaction. **Poultry Science**, v. 90, n.1, p.211 –

222, 2011.

ROSA, O. O., CARVALHO, E. P. de. Características microbiológicas de frutos e hortaliças minimamente processados. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 84-92, 2000.

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.

SATO G. S. Hortaliças minimamente processadas: uma atividade agroindustrial no interior de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 39, n. 2, 2009.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas Estudos de mercado do SEBRAE/ESPM. **Hortaliças Minimamente Processadas**, 2008.

SENIORANS, F. J., IBANEZ, E., CIFUENTES, A. New Trends in food processing. **Food Science and Nutrition**, Inglaterra, v. 43, n. 5, p. 507-526, 2003.

SILVA, P.R. Uma abordagem sobre o mercado de hortaliças minimamente processadas. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.38, n. 4, 2008.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. 3ª edição, **Editora Varela**, Campinas, São Paulo, p. 544, 2007.

SILVA, S. R. P. et al. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 594-598, 2007.

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.

SIVAPALASINGAM, S., FRIEDMAN, C. R., COHEN, L., TAUXE, R. V. Fresh produce: growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States. **Journal of Food Protection**, n. 67, p. 2342–2353, 2004.

SMANIOTO, T. F. et al. Contribuição ao estudo da qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 150-154, 2009.

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.

TOLEDO, J. C., BORRÁS, M. A. A., SACALCO, A. R., LIMA, L.S. Coordenação da qualidade em cadeias de produção: estrutura e método para cadeias agroalimentares. **Gestão & Produção**, v.11, n.3, p.355-372, 2004.

TOURNAS, V. H. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables and sprouts. **International 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.

WHO – World Health Organization, **Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC)**, Fact sheet N°125, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>, Acesso em: 05/11/2014.

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.

Anexo 1. Identificação e genoma completo de algumas bactérias isoladas das amostras de couve minimamente processada

Amostra 1 - Colônia de bactéria 1.1 - 100% de similaridade com a sequência de *Staphylococcus aureus*

>gi|595636499|gb|CP007454.1| *Staphylococcus aureus* strain 502A, complete genome

```
GTATTTACTCAAATCAACGTCATATACACATGGTCCCTAAACATTGTCCAATATGGTAATAAAGACATAAT
TTATCTGGCATCTTATCACATTTGCGATATGGATATATTTCTGTCTAATAACTTTTTAGTTTCTTGAGCAG
AAATATGCATTTTCGGATACGGTCCGAAATATTTGCCAGTACCTTGTTTTACAGTTCTCGTCACTAGTAGT
CTAGGATATTTCTCCTTCGTAATTTTAATAAAATGGATAACTTTTATCATCCTTTAATAATATATATATC
TTGGTTGATATTGTTTTATCAGATTCAATTCCAGTAAAAGTGACTCTGTTTCACTTGACGTGACAATAAA
CTCAAAACGACGTATTTACCAACCAGTCTCGTTGTTTTAGCATCATGAGCACCCGGTAAAATATGATCT
CAATCGATTTCTTAGCTTTTTAGCTTTTGCCAACATATATCACTTGATCATTACGATCTTTCATTAAATAG
CAGCCTGGTTCCATAGGTACGACATTTAATTTATTTTTAATTCGTTGCTTATAGTCTTCCAAAAATATCC
CCCCTTCAATTTTAAAAATGAATGATGCTACAAAAGTGCTCAAATTTATCACCCTAATTCTAGCTCAT
AATCAACATCTTCGAGTATGACTTTTCATGCACATCATGTAATATTGAACATGGTTTTATCAAACCACT
GCTACAAATCTATCAGCATGCTAGATTATCATTTAACGTTTCATAGATTTTAAATCCCACCATTCTCAAG
TCGTAAACAATATGATGACTTATCATTTCACTTTTTATATTAATAAACACAAAACAAAACCTGGAGCAATTC
ATTAAGAAAATGCCCGAGTCGTCATTGGTTATAAATTATAAATGTTTATCTAAAACCTCAGCTAAGTTTT
```

Amostra 1 - Colônia de bactéria 1.2 - 100% de similaridade com a sequência de *Listeria monocytogenes*

>gi|523848303|gb|CP006597.1| *Listeria monocytogenes* strain N1-011A, complete genome

```
AAAATTTAAAGAAATTAATGGATTTCAGTGTGGTTGAATTCCTTTCTAGTTTAAAAGTGGAAGGCGATT
ATTGAACTTAATGAAGAAAAGCGTATTCTCGACCTACAAGAACATTCAGGTTTTGAAAGTAGTGGTAGTT
TCACGAATACTTTTAAAAAATATACAGGTAGTTCTCCTAGAAAATACAAAACGGAAATGAATGATATTTT
TTATGATATGAAACGTTTTGAAAATGATAATAAGGATAAGTCGATAGCGCATTTTCAAGAAAAGAATGAT
TCTTTTTGTACGGTAACTATTGATGTACCTGATGAATTTGAGAAGGGTATCATATTTATTGGACTTTTCC
GTACTCTTATAACGAATCATATGCCTATATCGGGATTAGCTACTAAAAATTTAATAGGAAATCAATTGAA
AAATATTTCCAAGTGGAGACTATTATTTATTAGCTTGTGCGATAAGCCAGTCTAATAACATTCTATCTTAT
TTTAACCTAAGTAATAGTTTGAGAGGGAAAGAAGATGAAAAGCTATCTTTTCCCTAAATGTTCTGGCAAGC
ATTACGCGATTAAGCTGAGAGAACCAATACCAGAAGATCCGCCAATATTAGCTAATGTGGGAAAATTTT
```

Amostra 2 - Colônias de bactérias 2.1 e 2.3 - 100% de similaridade com a sequência de *Listeria monocytogenes*

>gi|523848303|gb|CP006597.1| *Listeria monocytogenes* strain N1-011A, complete genome

```
AAAATTTAAAGAAATTAATGGATTTCAGTGTGGTTGAATTCCTTTCTAGTTTAAAAGTGGAAGGCGATT
ATTGAACTTAATGAAGAAAAGCGTATTCTCGACCTACAAGAACATTCAGGTTTTGAAAGTAGTGGTAGTT
TCACGAATACTTTTAAAAAATATACAGGTAGTTCTCCTAGAAAATACAAAACGGAAATGAATGATATTTT
TTATGATATGAAACGTTTTGAAAATGATAATAAGGATAAGTCGATAGCGCATTTTCAAGAAAAGAATGAT
TCTTTTTGTACGGTAACTATTGATGTACCTGATGAATTTGAGAAGGGTATCATATTTATTGGACTTTTCC
GTACTCTTATAACGAATCATATGCCTATATCGGGATTAGCTACTAAAAATTTAATAGGAAATCAATTGAA
AAATATTTCCAAGTGGAGACTATTATTTATTAGCTTGTGCGATAAGCCAGTCTAATAACATTCTATCTTAT
TTTAACCTAAGTAATAGTTTGAGAGGGAAAGAAGATGAAAAGCTATCTTTTCCCTAAATGTTCTGGCAAGC
```

ATTACGCGATTAAGCTGAGAGAACCAATACCAGAAGATCCGCCAATATTAGCTAATGTGGGAAAAATTTT

Amostra 2 - Colônia de bactéria 2.2 - 100% de similaridade com a sequência de *Clostridium botulinum*

>gi|521302384|gb|KC471328.1| Clostridium botulinum strain 161.08 botulinum neurotoxin B (bont/B) gene, complete cds

ATGCCAGTTACAATAAATAATTTTAATTATAATGATCCTATTGATAATAATAATATTATTATGATGGAAC
CTCCATTTGCGAGAGGTATGGGGAGATATTATAAAGCTTTTAAAATCACAGATCGTATTTGGATAATACC
GGAAAGATATACTTTTGGGTATAAACCTGAGGATTTTAATAAAAAGTTCCGGTATTTTAAATAGAGATGTT
TGTGAATATTATGATCCAGATTACTTAAATACTAATGATAAAAAAATATATTTTACAAACAATGATCA
AGTTATTTAATAGAATCAAATCAAACCATTGGGTGAAAAGTTATTAGAAATGATTATAAATGGTATAACC
TTATCTTGGAGATAGACGTGTTCCACTCGAAGAGTTTAAACACAAACATTGCTAGTGTAACTGTTAATAAA
TTAATTAGTAATCCAGGAGAAGTGGAGCGAAAAAAGGTATTTTGCAAATTTAATAATATTTGGACCTG
GGCCAGTTTAAATGAAAATGAGACTATAGATATAGGTATACAAAATCATTTTGCATCAAGGGAAGGCTT

Amostra 3 - Colônia de bactéria 3.1 - 100% de similaridade com a sequência de *Enterococcus faecalis*

>gi|582035815|gb|CP004081.1| Enterococcus faecalis DENG1, complete genome

TTTTAAGTTATCCACATTTTTTAGATAACCAAAATTTAAACATATAGGAGGTCACGTGTATGCCCGACGTG
AAAAGTTTTTGGCATAGCCTTGAAGAAGCCTATCAAGCGATTTTGTCCGGCCCAAGTTTTGATGCTTGGA
TTAAAACCACACGCCCTTTGAAATTAGACAACAATCAATTGTGGCTAGAAGTCCCTTCTGCAGTTCATCG
TGATTACTGGGAAAAAATCTTTCCGGCAAAAATTTGTCGAAACTGGATTTAAATTGACCGGTGCAGAAGTG
ATGCCCATTTTTGTTGTTGCCGATGAAAAAGACGCAGCACTGGCACAAGAAGTCCGAAGAAGCTGCCGAAG
AAGAAGTTGTTTTTAGTGAACAAAGTAAAAAGCGATGCTTAATCCTAAGTACACTTTCGACACCTTCGT
TATTGGTAAAGGAAACCAATGGCTCACGCTGCAGCGCTTGTGTTGCCGAGGATCCAGGTTTCGATTTAC

Amostra 3 - Colônia de bactéria 3.2 - 100% de similaridade com a sequência de *Pseudomonas aeruginosa*

>gi|610413304|gb|CP007224.1| Pseudomonas aeruginosa PA96 genome

TTTAAAGAGACCGGCGATTCTAGTGAATCGAACGGCAGGTCAATTTCCAACCAGCGATGACGTAATAG
ATAGATAACAAGGAAGTCATTTTTCTTTTAAAGGATAGAAACGGTAAATGCTCTTGGGACGGCGCTTTTCT
GTGCATAACTCGATGAAGCCAGCAATTGCGTGTTCCTCCGGCAGGCAAAAGGTTGTCGAGAACCAGGTTG
CGACGCTGTTTCCTTCCTGAGCGAAGCCTGGGGATGAACGAGATGGTTATCCACAGCGGTTTTTCCACA
CGGCTGTGCGCAGGGATGTACCCCTTCAAAGCAAGGGTTATCCACAAAGTCCAGGACGACCGTCCGTCG
GCCTGCCTGCTTTTTATTAAAGTCTTGATTTGCTTGGGGCCTCAGCGCATCGGCATGTGGATAAGTCCGGC
CCGTCCGGCTACAATAGGCGCTTATTTCTGTTGTGCCCTTTCCAATCTTTGGGGGATATCCGTGTCCGT
GGAATTTGGCAGCAGTGGTGGATCTTCTCCGCGATGAGCTGCCGTCCAACAATTCAACACCTGGATC

Amostra 3 - Colônia de bactéria 3.3 - 100% de similaridade com a sequência de *Escherichia coli* O157:H7

>gi|666001753|gb|CP008805.1| Escherichia coli O157:H7 str. SS17, complete genome

AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCTCTGTGTGGATTAAAAAAGAGTCTCTGACAGCAGC
TTCTGAACTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATTTAAATTTTATTGACTTAGGTCACTAAATACTTTAAACAA
TATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAAATTACAGAGTACACAACATCCATGAAACGCATTAGCACCACC
ATTACCACCACCATCACCACCACCATCACCATTACCATTACCACAGGTAACGGTGCAGGCTGACGCGTAC
AGGAAACACAGAAAAAAGCCCGCACCTGACAGTGCAGGCTTTTTTTTTCGACCAAAGGTAACGAGGTAACA
ACCATGCGAGTGTGAAGTTCGGCGGTACATCAGTGGCAAATGCAGAACGTTTTCTGCGGGTTGCCGATA
TTCTGAAAGCAATGCCAGGCAGGGCAGGTGGCCACCGTCTCTCTGCCCCCGCCAAAATCACCAACCA

Amostra 3 - Colônia de bactéria 3.4 - 100% de similaridade com a sequência de *Staphylococcus aureus*

>gi|595636499|gb|CP007454.1| Staphylococcus aureus strain 502A, complete genome

```
GTATTTACTCAAATCAACGTCATATACACATGGTCCTAAACATTGTCCAATATGGTAATAAAGACATAAT
TTATCTGGCATCTTATCACATTTGCGATATGGATATATTTCTGTCTAATAACTTTTTAGTTTCTTGAGCAG
AAATATGCATTTTCGGATACGGTCCGAAATATTTGCCAGTACCTTGTTTTACAGTTCTCGTCACTAGTAGT
CTAGGATATTTCTCCTTCGTAATTTTAATAAAATGGATAACTTTTATCATCCTTTAATAATATATTATATC
TTGGTTGATATTGTTTTATCAGATTCAATTCCAGTAAAAGTGACTCTGTTTCACTTGACGTGACAATAAA
CTCAAAACGACGTATTTACCAACCAGTCTCGTTGTTTTAGCATCATGAGCACCCGGTAAAATATGATCT
CAATCGATTTCTTAGCTTTTTAGCTTTTGCCAACATATATCACTTGATCATTACGATCTTTCATTAATAG
CAGCCTGGTTCCATAGGTACGACATTTAATTTATTTTTAATTCGTTGCTTATAGTCTTCCAAAAATATCC
CCCCTTCTAATTTTAAAAATGAATGATGCTACAAAAGTGCTTCAAATTTATCACCCTAATTCTAGCTCAT
AATCAACATCTTCGAGTATGACTTTTTCATGCACATCATGTAATATTGAACATGGTTTTATCAAACCACT
GCTACAAATCTATCAGCATGCTAGATTATCATTTAACGTTTCATAGATTTATTAATCCCACCATTCTCAAG
TCGTAAACAATATGATGACTTATCATTTCACTTTTTATATTAATAAACACAAAACAAAACCTGGAGCAATTC
ATTAAGAAATGCCCGAGTCGTCATTGGTTATAACTTATAAATGTTTTATCTAAAACCTCAGCTAAGTTTT
```

Amostra 3 - Colônia de bactéria 3.5 - 100% de similaridade com a sequência de *Salmonella enterica subsp. enterica*

>gi|682093565|gb|CP009088.1| Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis strain OLF-SE6-00219-16, complete genome

```
AGGTAACGGTGCAGGCTGACGCGTACAGGAAACACAGAAAAAGCCCGCACCTGAACAGTGCAGGGCTTTT
TTTTCGACCAGAGATCACGAGGTAACAACCATGCGAGTGTGAAGTTCGGCGGTACATCAGTGGCAAATG
CAGAACGTTTTCTGCGTGTGCGGATATTTCTGAAAGCAATGCCAGGCAAGGGCAGGTAGCGACCGTACT
TTCCGCCCCCGGAAAAATTACCAACCATCTGGTGGCGATGATTGAAAAAACTATCGGCGGCCAGGATGCT
TTGCCGAATATCAGCGATGCCGAACGATTTTTTCTGACCTGCTCGCAGGACTTGCCAGCGCGCAGCCGG
GATTCCCGCTTGACGGTTGAAAATGGTTGTGCAACAAGAATTCGCTCAGATCAAACATGTTTTGCATGG
TATCAGCCTGCTGGGTGAGTGCCTGGATAGCATCAACGCCGCGCTGATTTGCCGTGGCGAAAAAATGTCCG
ATCGCGATTATGGCGGGACTTCTGGAGGCGCGTGGGCATCGCGTCACGGTGATCGATCCGGTAGAAAAAC
TGTTGGCGGTGGGCCATTACCTTGAATCTACCGTCGATATCGCGGAATCGACTCGCCGTATCGCCGCCAG
```

Amostra 4 - 100% de similaridade com a sequência de *Staphylococcus aureus*

>gi|595636499|gb|CP007454.1| Staphylococcus aureus strain 502A, complete genome

```
GTATTTACTCAAATCAACGTCATATACACATGGTCCTAAACATTGTCCAATATGGTAATAAAGACATAAT
TTATCTGGCATCTTATCACATTTGCGATATGGATATATTTCTGTCTAATAACTTTTTAGTTTCTTGAGCAG
AAATATGCATTTTCGGATACGGTCCGAAATATTTGCCAGTACCTTGTTTTACAGTTCTCGTCACTAGTAGT
CTAGGATATTTCTCCTTCGTAATTTTAATAAAATGGATAACTTTTATCATCCTTTAATAATATATTATATC
TTGGTTGATATTGTTTTATCAGATTCAATTCCAGTAAAAGTGACTCTGTTTCACTTGACGTGACAATAAA
CTCAAAACGACGTATTTACCAACCAGTCTCGTTGTTTTAGCATCATGAGCACCCGGTAAAATATGATCT
CAATCGATTTCTTAGCTTTTTAGCTTTTGCCAACATATATCACTTGATCATTACGATCTTTCATTAATAG
CAGCCTGGTTCCATAGGTACGACATTTAATTTATTTTTAATTCGTTGCTTATAGTCTTCCAAAAATATCC
CCCCTTCTAATTTTAAAAATGAATGATGCTACAAAAGTGCTTCAAATTTATCACCCTAATTCTAGCTCAT
AATCAACATCTTCGAGTATGACTTTTTCATGCACATCATGTAATATTGAACATGGTTTTATCAAACCACT
GCTACAAATCTATCAGCATGCTAGATTATCATTTAACGTTTCATAGATTTATTAATCCCACCATTCTCAAG
TCGTAAACAATATGATGACTTATCATTTCACTTTTTATATTAATAAACACAAAACAAAACCTGGAGCAATTC
```

ATTAAAGAAATGCCCCAGTCGTCATTGGTTATAACTTATAAATGTTTATCTAAAACCTTCAGCTAAGTTTT

Amostra 5 - Colônias de bactérias 5.1, 5.2 e 5.3 - 100% de similaridade com a sequência de *Listeria monocytogenes*

>gi|523848303|gb|CP006597.1| *Listeria monocytogenes* strain N1-011A, complete genome

AAAATTTAAAGAAATTAATGGATTTCAGTGTGGTTGAATTCCTTTCTAGTTTAAAAGTGGAAAAGGCGATT
 ATTGAACTTAATGAAGAAAAGCGTATTCTCGACCTACAAGAACATTCAGGTTTTGAAAGTAGTGGTAGTT
 TCACGAATACTTTTTAAAAAATATACAGGTAGTTCTCCTAGAAAATACAAAACGGAAATGAATGATATTTT
 TTATGATATGAAACGTTTTGAAAATGATAATAAGGATAAGTCGATAGCGCATTTTCAAGAAAAGAATGAT
 TCTTTTTGTACGGTAACATTTGATGTACCTGATGAATTTGAGAAGGGTATCATATTTATTGGACTTTTCC
 GTACTCTTATACCGAATCATATGCCTATATCGGGATTAGCTACTAAAAATTTAATAGGAAATCAATTGAA
 AAATATCCAAGTGGAGACTATTATTTATTAGCTTGTGCGATAAGCCAGTCTAATAACATTCTATCTTAT
 TTTAACTTAAGTAATAGTTTGAGAGGGAAAGAAGATGAAAAGCTATCTTTTCTAAATGTTCTGGCAAGC
 ATTACGCGATTAAGCTGAGAGAACCAATACCAGAAGATCCGCCAATATTAGCTAATGTGGGAAAAATTTT

Amostra 6 - Colônia de bactéria 6.1 - 100% de similaridade com a sequência de *Escherichia coli* O157:H7

>gi|666001753|gb|CP008805.1| *Escherichia coli* O157:H7 str. SS17, complete genome

AGCTTTTCATTCTGACTGCAACGGGCAATATGTCTCTGTGTGGATTAAAAAAGAGTCTCTGACAGCAGC
 TTCTGAACTGGTTACCTGCCGTGAGTAAATTTAAATTTTATTGACTTAGGTCACTAAATACCTTAACCAA
 TATAGGCATAGCGCACAGACAGATAAAAAATTACAGAGTACACAACATCCATGAAACGCATTAGCACCACC
 ATTACCACCACCATCACCACCACCATCACCATTACCATTACCACAGGTACGGTGCGGGCTGACGCGTAC
 AGGAAACACAGAAAAAAGCCCGCACCTGACAGTGCGGGCTTTTTTTTCGACCAAAGGTAACGAGGTAACA
 ACCATGCGAGTGTGAAAGTTCGGCGGTACATCAGTGGCAAATGCAGAACGTTTTCTGCGGGTTGCCGATA
 TTCTGGAAAGCAATGCCAGGCAGGGCAGGTGGCCACCGTCCTCTCTGCCCCGCCAAAATCACCAACCA