



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

MARIANA RODRIGUES GOMES DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS
MINIMAMENTE PROCESSADOS COMERCIALIZADOS NOS SUPERMERCADOS
DE BRASÍLIA E APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

**BRASÍLIA, DF
2016**

MARIANA RODRIGUES GOMES DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS
MINIMAMENTE PROCESSADOS COMERCIALIZADOS NOS SUPERMERCADOS
DE BRASÍLIA E APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

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

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

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

BRASÍLIA, DF
2016

MARIANA RODRIGUES GOMES DA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE VEGETAIS
MINIMAMENTE PROCESSADOS COMERCIALIZADOS NOS SUPERMERCADOS
DE BRASÍLIA E APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA
IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF
2016

Agradecimentos

Após cinco anos de muito esforço, dedicação e aprendizado este trabalho é o resultado final do curso que vai me permitir desempenhar a profissão que eu escolhi. Por saber que não cheguei até aqui sozinha, gostaria de agradecer a Deus pela chance de viver esta realização, e as pessoas que Ele colocou no meu caminho e que fizeram parte desta trajetória. A minha mãe, Dona Marlene Rodrigues da Cruz, meu muito obrigado por me dar todo o suporte que eu precisei para estar aqui hoje. Obrigada mãe, por todas as oportunidades que você me permitiu ter, nós chegamos juntas a este momento como a dupla incrível que nós somos. Quero agradecer a Maria Clara, que é tão importante e presente na minha vida que participou ativamente deste trabalho. Obrigada prima, com a sua ajuda a execução deste TCC foi muito mais fácil e divertida. A minha família, obrigada pelo apoio e presença confortadora de sempre. Aos meus amigos, que estiveram junto comigo na jornada até aqui, e que entendem o sentimento de estar concluindo esta etapa, muito obrigada por tudo, que tudo valha a pena para todos nós. A minha orientadora Daniela Orsi, que desde 2015 vem compartilhando comigo o imenso saber dela, e que deveria ganhar o Oscar de melhor orientadora do mundo. Muito obrigada prof, sem você este trabalho não seria possível. Obrigada a minha co-orientadora, Prof. Isabel pela ajuda nas PCRs. Obrigada a todos que fizeram parte da minha vida ao longo destes 5 anos, cada um é importante a sua maneira.

RESUMO

Neste trabalho foram realizadas as análises microbiológicas de treze amostras de oito marcas diferentes de vegetais minimamente processados. As amostras foram coletadas em seis diferentes supermercados de Brasília-DF, no período entre março de 2015 e maio de 2016. Os resultados das análises mostraram que sete amostras (53,8%) estavam impróprias para o consumo humano. Das sete amostras reprovadas para o consumo, seis amostras (amostras 1, 2, 4, 7, 12 e 13) continham coliformes termotolerantes acima dos valores permitidos pela legislação brasileira ($>1,0 \times 10^2$ NMP/g). As amostras 9, 12 e 13 apresentaram *Salmonella sp.*, uma bactéria patogênica considerada um risco para a saúde do consumidor e um indicativo de contaminação fecal. Detectou-se bactérias *S. aureus* em 6 amostras (46,1% das amostras), sendo que 5 amostras continham quantidades destas bactérias superiores a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, o que indicou falta de higiene na produção. A amostra 9, que já estava reprovada para o consumo pela presença de *Salmonella*, também estava com contagem de *S. aureus* acima do permitido na legislação ($>1,0 \times 10^3$ UFC/g). Com relação à flora deteriorativa, das 13 amostras analisadas, foi observada uma elevada contagem total de bactérias mesófilas e/ou psicrótróficas (acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g) em 9 amostras (69,2%). E 76,9% dos vegetais minimamente processados (10 amostras) apresentaram elevada quantidade de coliformes totais, com enumeração acima de $1,0 \times 10^3$ NMP/g. As altas cargas microbianas desses produtos podem ser resultado da temperatura de armazenamento inadequada nas gôndolas dos supermercados. Outro ponto possível do aumento na carga bacteriana é o excessivo tempo de armazenamento desses produtos, sugerindo que 7 a 10 dias de validade é um prazo inadequado para a conservação de produtos tão perecíveis.

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

ABSTRACT

In this work, the microbiological analyzes of thirteen samples of eight different brands of minimally processed vegetables were carried out. The samples were collected from six different supermarkets in Brasília-DF, between March 2015 and May 2016. The results of analyzes showed that seven samples (53.8%) were unfit for human consumption. Six samples (samples 1, 2, 4, 7, 12 and 13) contained thermotolerant coliforms above the values allowed by Brazilian legislation ($>1.0 \times 10^2$ MPN/g). The samples 9, 12 and 13 showed *Salmonella* sp., a pathogenic bacterium considered a health risk to the consumer and an indication of fecal contamination. *S. aureus* bacteria were detected in 6 samples (46.1% of the samples) and 5 samples contained counts of these bacteria higher than 1.0×10^2 CFU/g, indicating lack of hygiene in the production. The sample 9, which was already rejected for consumption by the presence of *Salmonella*, also had a *S. aureus* count above that allowed by legislation ($> 1.0 \times 10^3$ CFU/g). Regarding the deteriorating flora, of the 13 samples analyzed, a high total count of bacteria (mesophilic and / or psychrotrophic) was observed in 9 samples (69.2%). And 76.9% of the minimally processed vegetables (10 samples) presented a high enumeration of total coliforms (enumeration above 1.0×10^3 MPN/g). The high bacterial counts of these products may be the result of improper storage temperature in supermarkets. Another possible point of increase in bacterial counts is the excessive storage time of these products, suggesting that 7 to 10 days of shelf life is an inadequate period for the conservation of such perishable products.

Key words: minimally processed vegetables, food safety, foodborne diseases, molecular analyzes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3. JUSTIFICATIVA.....	18
4. METODOLOGIA.....	19
4.1 Coleta e preparo das amostras	19
4.2 Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas.....	20
4.3 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes	20
4.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	22
4.5 Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp.....	24
4.6 Análises moleculares e extração de DNA bacteriano	24
4.7 Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR.....	26
4.8 PCR qualitativo	29
4.9 Eletroforese em gel de agarose	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas	30
5.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes	32
5.3 . Determinação da presença de <i>Salmonella</i> sp.....	34
5.4 Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp.	35
5.5 Análises moleculares.....	38
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

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%.....	22
Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.....	28
Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	28
Tabela 4. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotóricas nas amostras de vegetais minimamente processados.....	30
Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de vegetais minimamente processados.....	32
Tabela 6. Contagem das colônias no <i>Staphylococcus aureus</i> (colônias fermentadoras de manitol e após coloração de gram), nas amostras de vegetais minimamente processados.....	36
Tabela 7. Identificação por meio de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de vegetais minimamente processados comercializados em Brasília-DF.....	39
Tabela 8. Classificação das amostras de vegetais minimamente processados em aprovadas, satisfatórias e reprovadas para consumo humano.....	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.....	10
Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI.....	24
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene EutC de <i>E. coli</i>	40
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene entC de <i>S. aureus</i>	41
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do <i>invA</i> de <i>Salmonella enterica</i>	42
ANEXOS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vegetais minimamente processados: definição, consumo e produção

Segundo a International Fresh Cut Producers Association (IFPA, 2001), frutas e hortaliças fisicamente modificadas, mas que mantêm o estado fresco podem ser consideradas produtos minimamente processados. Podem ainda ser definidos como vegetais que foram alterados fisicamente para mudar sua apresentação ao consumo, ou seja, picados, descascados ou ralados, dentre outros processos, mas que se mantêm frescos e com atividade metabólica ativa. Porém, apesar de apresentarem tecidos vivos, estes não apresentam as mesmas respostas fisiológicas que vegetais intactos.

Várias são as denominações utilizadas para frutas e hortaliças higienizadas e processadas. Podem-se utilizar os termos pré-cortados, levemente processados, parcialmente processados, pré-preparados ou minimamente processados. Sendo este último mais utilizado por definir melhor as características deste tipo de produto (Cenci, 2011).

O hábito de consumir frutas e hortaliças tem evidente efeito benéfico na saúde e pode prevenir a ocorrência de doenças crônicas e câncer. Estes alimentos possuem uma grande diversidade de compostos funcionais, como vitaminas, polifenóis, carotenoides, fitoquímicos entre outros, que possuem propriedades antimutagênicas, anticancerígenas e que podem inibir alguns tipos de câncer quimicamente induzidos (American Institute of Cancer Research, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda uma meta de ingestão diária de no mínimo 400g de frutas e hortaliças ao dia. A OMS introduziu campanhas de “cinco-ao-dia”, para encorajar a população a comer pelo menos 5 porções diárias de frutas e legumes todos os dias. Incentivos e campanhas como essa tem contribuído para aumentar o consumo de frutas e vegetais nas últimas duas décadas (Abadias et al., 2008; Goodburn & Wallace, 2013).

A procura dos consumidores por uma dieta mais equilibrada e saudável, com maior quantidade e variedade de frutas e hortaliças frescas, associada à necessidade de praticidade no dia a dia levou o mercado a investir em produtos frescos minimamente processados. Para atender a essa demanda, as indústrias

desenvolveram novas tecnologias de conservação e processamento mínimo, de modo que o produto esteja seguro e pronto para o consumo dentro do prazo de validade estabelecido (Moretti, 2007; Paula et al., 2009).

Nos Estados Unidos, os vegetais minimamente processados são comercializados desde 1970, mas no Brasil este tipo de produto só passou a estar disponível nos supermercados a partir da década de 90 (Oliveira et al., 2011). 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. (2003), 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.

A cadeia produtiva de vegetais minimamente processados é composta por várias etapas, que são na sua ordem de execução: 1) colheita, transporte e armazenamento refrigerado (etapas pré-indústria de processamento); 2) seleção manual, lavagem do produto inteiro, operação de corte, lavagem e sanitização, enxágue com água potável, centrifugação, inspeção, mistura opcional e pesagem, embalagem/etiquetagem e armazenamento refrigerado para atacado (etapas na indústria de processamento) e 3) transporte e distribuição refrigerados, armazenamento, comercialização e só então o consumo (etapas pós-indústria de processamento) (Cenci, 2011).

A figura 1 apresenta 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.

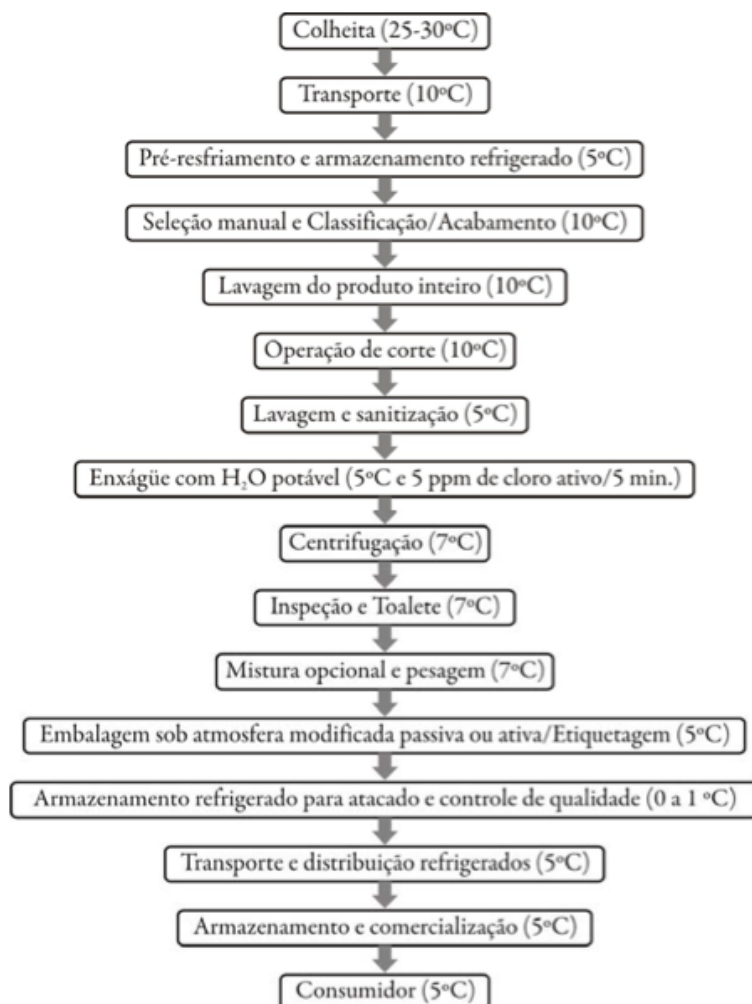


Figura 1. Fluxograma geral descrevendo as operações da cadeia produtiva dos produtos minimamente processados de uma unidade industrial com as temperaturas recomendadas para cada etapa

Fonte: Cenci (2011, p. 20).

Na unidade industrial de processamento mínimo a matéria prima deve passar pelas etapas de seleção, classificação e lavagem do produto inteiro. A primeira operação a que os vegetais minimamente processados são submetidos durante a produção é a lavagem com água, momento no qual serão retirados resíduos provenientes do solo e fragmentos da planta. Esta etapa pode consistir em apenas aspersão com água potável ou imersão em água refrigerada. É importante salientar que a água usada durante a produção deve ser potável, pois a falta qualidade pode contaminar os produtos com microrganismos patogênicos de origem fecal como *Salmonella*, *E. coli* patogênica, além de parasitas e vírus (Cenci, 2011).

É possível reduzir significativamente a população microbiana com a etapa de sanitização, onde são empregadas substâncias antimicrobianas. Porém a eficiência destes agentes antimicrobianos depende de fatores como temperatura da água, tempo de contato, natureza do alimento e carga microbiana inicial. A sanitização de hortaliças picadas 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 (Cenci, 2011).

A etapa de corte provoca um efeito drástico sobre o metabolismo dos produtos picados, aumentando a taxa respiratória. Os processos metabólicos que ocorrem nos alimentos minimamente processados, como oxidação de compostos fenólicos e perda da clorofila produzem alterações físicas importantes que podem prejudicar a qualidade do produto. Para prevenir prejuízos acarretados por estes processos metabólicos, o controle de temperatura (refrigeração a 5°C) associado ao uso estratégico de embalagens de atmosfera modificada pode ser eficiente (Moretti, 2007). 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 sete dias de armazenamento a 5°C, apresentando elevada aceitabilidade sensorial (Cenci, 2011).

Porém, geralmente a temperatura ideal de manipulação, transporte e armazenamento não são respeitados, o que pode provocar redução da qualidade dos produtos. A falta de controle de temperatura dos vegetais minimamente processados pode ocasionar proliferação de microrganismos patogênicos, colocando em risco a saúde do consumidor, além de reduzir o tempo de prateleira, gerando prejuízos para o produtor. A temperatura de 5°C apresenta a melhor relação custo/benefício para os vegetais minimamente processados. A temperatura a 10°C reduz em, no mínimo, cinquenta por cento a vida útil dos produtos, limitando

o tempo de comercialização e favorecendo considerável crescimento microbiano (Moretti, 2007).

1.2. Qualidade dos vegetais minimamente processados

Os procedimentos realizados durante o processamento mínimo têm como objetivo garantir segurança e qualidade, além de reduzir perdas e prejuízos. Para isso é necessário que se utilize de métodos que protejam os produtos de quaisquer tipos de danos e contaminações. Matérias-primas que já tem boa qualidade inicial resultam em um produto final com maior qualidade e vida útil (Cenci, 2011; Moretti, 2007).

Os principais fatores que determinam a qualidade de vegetais minimamente processados são: escurecimento enzimático, contaminação microbiológica, perda do valor nutricional, senescência e a descoloração da superfície. A composição das hortaliças minimamente processadas com alto teor de carbono e nitrogênio, alta atividade de água e pH quase neutro oferece ótimas condições para o desenvolvimento de bactérias e fungos, o que as torna altamente perecíveis (Cenci, 2011; Moretti, 2007).

A deterioração microbiana é um dos determinantes da qualidade que pode por em risco a saúde do consumidor e acontece principalmente devido a práticas inadequadas de cultivo, contaminações cruzadas, falta de higiene no processamento e/ou rompimento da cadeia do frio. Esses problemas de falta de qualidade (contaminação microbiana, presença de insetos, deterioração) e falta de adaptabilidade da matéria prima ao processamento mínimo dificultam a expansão do mercado (Cenci, 2011; Moretti, 2007).

Vegetais minimamente processados devem ser armazenados sob refrigeração, com temperatura ótima entre 0 e 5°C. O abuso da temperatura de armazenamento e transporte pode resultar em aumento da taxa de respiração celular, fermentação e proliferação de microrganismos patogênicos, o que põe em risco a saúde do consumidor. Para que seja considerado de alta qualidade, o produto minimamente processado deve manter aparência, textura, aroma e sabor de produtos frescos, além de ter um tempo de prateleira suficiente para chegar ao consumidor com essas características após a cadeia de distribuição (Cenci, 2011; Moretti, 2007).

A segurança de alimentos prontos para comer, principalmente os consumidos crus tem sido objeto de vários estudos. É importante identificar a origem de possíveis contaminantes para avaliar de maneira eficaz todas as etapas do processamento mínimo de vegetais e sua cadeia de produção (Silva, et. al., 2007).

1.3. Contaminação microbiológica dos vegetais minimamente processados

A presença de microrganismos patogênicos não está associada a uma má aceitação visual do alimento, já que pode ocorrer em vegetais com aparência agradável ao consumidor e sem apresentar deterioração de tecidos vegetais, um ponto crítico, pois o consumidor não é capaz de julgar esse aspecto da qualidade do alimento. O consumo de vegetais minimamente processados contaminados com grande quantidade de bactérias patogênicas pode causar doenças transmitidas por alimentos e em casos mais graves até causar a morte (Cenci, 2011; Sant'ana et al., 2011).

Em vegetais não processados, a casca íntegra é uma barreira natural contra o acesso de microrganismos aos tecidos do alimento. Durante o processamento, a manipulação favorece a contaminação microbiológica e as etapas de corte e retirada da casca expõe os tecidos vegetais e disponibiliza nutrientes para a ação deteriorativa destes microrganismos, o que pode diminuir a qualidade e tempo de vida útil e de prateleira dos vegetais minimamente processados (Cenci, 2011, Tresseler et al., 2009).

Diversas são as fontes de contaminação dos vegetais por microrganismos patogênicos. A contaminação pode ocorrer na fase de produção, devido ao contato com o solo, fezes de animais, insetos, água e trabalhadores; na fase de colheita, manipulação e transporte desses vegetais para as indústrias, durante o processamento e ainda pelo manuseio do consumidor em casa (Cenci, 2011; Paula et al., 2009; Silva, et. al., 2007).

É preferível que a contaminação seja evitada a aplicar métodos para correção após a contaminação prévia. Assim medidas devem ser tomadas para evitar estes problemas, como implementação de Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Produção (BPP) e do Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) (Cenci, 2011; Moretti, 2007).

Alimentos frescos minimamente processados tem microbiota comumente composta por espécies bacterianas das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae e fungos em quantidades menores. Dentre os microrganismos geralmente associados à deterioração vegetal podem-se destacar *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Enterobacter*, *Chromobacterium* e *Flavobacterium*, assim como bactérias lácticas, que podem se proliferar rapidamente, alcançando populações superiores a 10^7 UFCg e acumulando metabólitos como ácido láctico, etanol e acetato de etila (Cenci, 2011).

Uma das estratégias para retardar o crescimento microbiano e consequente deterioração dos produtos minimamente processados é o uso de baixas temperaturas. Porém esta técnica não inibe o crescimento das bactérias psicotróficas como *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila* que tem a capacidade de crescer bem em temperatura de geladeira, assumindo importância na deterioração desses alimentos. Estes microrganismos tem maior risco de se proliferar em alimentos mantidos por longos períodos sob-refrigeração ou em menos tempo quando há abuso da temperatura de estocagem (Cenci, 2011).

1.4. Vegetais minimamente processados e doenças transmitidas por alimentos

Devido à transição demográfica relacionada ao envelhecimento da população e as novas tendências de estilo de vida com aumento na demanda por vegetais minimamente processados prontos para o consumo, tem havido uma mudança no cenário das doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, com impactos econômicos e sociais importantes (Oliveira et. al, 2011). Segundo vários estudos, os casos de infecções do trato gastrointestinal associado ao consumo de produtos frescos de origem vegetal têm aumentado drasticamente nas últimas décadas (Brandl, 2006; Herman et al., 2015; Little and Gillespie, 2008; Lynch et al., 2009).

Diversas bactérias patogênicas e parasitas estão associadas a surtos de infecção alimentar por consumo de frutas e hortaliças frescas. Dentre os microrganismos que tem casos documentados de infecção alimentar estão *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Shigella*, *Escherichia coli* (O157:H7), *Bacillus cereus*,

Listeria monocytogenes, entre outros que são de interesse para a saúde pública (Cenci, 2011; Delaquis et al., 2007; Herman et al., 2015; Soderstrom et al., 2008).

Durante a colheita, a microbiota superficial dos vegetais é composta principalmente de bactérias Gram negativas saprófitas, mas microrganismos patogênicos também podem ser encontrados. Estes alimentos podem conter espécies patogênicas como *Escherichia coli* e *Salmonella spp.*, ambas bactérias entéricas envolvidas em muitos casos infecções alimentares no mundo todo (Delaquis et al., 2007; Herman et al., 2015; Oliveira et. al, 2011; Soderstrom et al., 2008). *Listeria monocytogenes*, uma bactéria psicrófila e ubíqua que resiste a baixas temperaturas também pode ser um contaminante de vegetais minimamente processados e causar listeriose, uma infecção atípica que tem baixa taxa de mortalidade, mas em populações de risco como idosos, grávidas e pessoas imunocomprometidas pode levar a óbito (Oliveira et. al, 2011; Sant'ana et al., 2012).

Recentemente, os vegetais frescos estão sendo cada vez mais reconhecidos como veículos potenciais para doenças transmitidas por alimentos, com ênfase em surtos internacionais graves, como os associados com tomates contaminados com *Salmonella* na Europa e com espinafres contaminados com *E. coli* O157 nos Estados Unidos em 2011 (Campos et. al., 2013). Entre 1999 e 2008 foram reportados 6062 surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, sendo que 144 desses surtos estavam ligados ao consumo de vegetais (Sant'ana et al., 2014).

1.5. Legislação brasileira vigente

De acordo com a RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, a quantidade limite para coliformes a 45 °C ou termotolerantes é de 10^2 NMP/g. Já *Salmonella* deve estar ausente em 25g para hortaliças, legumes e similares, frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanitizadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto. Para *Staphylococcus aureus* a quantidade máxima permitida é de $1,0 \times 10^3$ UFC/g em saladas prontas para o consumo (BRASIL, 2001).

1.6. Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas em alimentos

Geralmente para detecção e identificação de bactérias em alimentos, usa-se técnicas de microbiologia com base em meios de cultura seletivos e não seletivos, testes bioquímicos para diferenciação de enzimas produzidas e provas sorológicas (Gandra, et al., 2008). Porém, mesmo sendo métodos conceituados e tradicionais, estes tem limitações e desvantagens, sendo passíveis de erros de interpretação dos operadores e interferências do ambiente, além de demandar muito tempo para obtenção dos resultados (Farber et al., 2001; Marin et al., 2006).

Atualmente, houve um aumento significativo no uso de novas técnicas para detectar e identificar bactérias patogênicas em amostras de alimentos. Os métodos para tipagem genética são baseados no princípio de caracterização do DNA cromossômico, de plasmídeos e de enzimas produzidas pelos microrganismos. Essas técnicas podem ser aplicadas diretamente em avaliações microbiológicas de qualidade de alimentos e também para detectar presença de bactérias patogênicas. Assim, pode-se destacar a reação em cadeia da polimerase (PCR), que é fundamentada na amplificação de sequências de DNA. A PCR é um método muito sensível de modo que mesmo com pouca quantidade de DNA é possível obter milhares de cópias de sequência alvo, com identificação de espécie em estudo (Gandra, et al., 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo realizar análises microbiológicas e moleculares em diferentes marcas de vegetais minimamente processados comercializados em supermercados do Distrito Federal e a partir dos resultados obtidos, determinar a qualidade destes produtos.

2.2 Objetivos específicos

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

3. JUSTIFICATIVA

Frutas e hortaliças frescas possuem altas concentrações de vitaminas e minerais e são essenciais na dieta da população mundial. Com o aumento da conscientização da população sobre a importância de uma dieta saudável, há uma maior procura por alimentos frescos de fácil consumo, ou seja, prontos para comer. Com isso, o mercado de vegetais minimamente processados ganhou mais espaço, de modo que mais produtores estão investindo nesse ramo. Assim, com uma produção em ampla escala, nem sempre a qualidade e segurança desses produtos está garantida.

Em 2008, a Organização Mundial de Saúde considerou vegetais de folhas verdes como a principal prioridade a ser observada em termos de segurança alimentar (Goodburn & Wallace, 2012). Considerando a importância da qualidade desses tipos de alimentos, neste trabalho analisou-se a qualidade microbiológica de vegetais minimamente processados comercializados em supermercados do DF para determinar se estes possuíam segurança para consumo.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta e preparo das amostras

Foram coletadas treze amostras de oito marcas diferentes de vegetais minimamente processados comercializados em seis diferentes supermercados de Brasília-DF, entre março de 2015 e maio de 2016.

As amostras avaliadas foram:

- 1) Mistura para yakissoba, composta por cenoura, acelga, brócolis e couve flor em pedaços (marca 1, data de coleta 24/03/15);
- 2) Salada de alface, rúcula, cenoura fatiada e tomate (marca 2, data de coleta 07/04/15);
- 3) Salada de alface, tomate, milho, queijo e cogumelo (marca 3, data de coleta 21/04/15);
- 4) Salada de alface, agrião e cenoura (marca 1, data de coleta 12/05/15);
- 5) Salada de cenoura, repolho verde e repolho roxo, ambos fatiados (marca 4, data de coleta 23/06/15);
- 6) Broto de alfafa (marca 5, data de coleta 30/06/15);
- 7) Couve fatiada (marca 6, data de coleta 24/08/15);
- 8) Salada de alface (marca 7, data de coleta 08/09/15);
- 9) Vagem fatiada (marca 6, data de coleta 28/09/15);
- 10) Couve fatiada (marca 8, data de coleta 16/11/15);
- 11) Mistura para yakissoba, composta por cenoura, acelga, brócolis e repolho em pedaços (marca 1, data de coleta 05/04/16);
- 12) Couve fatiada (marca 1, data de coleta 26/04/16);
- 13) Couve fatiada (marca 2, data de coleta 10/05/16).

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

Para o preparo das amostras, em condições de assepsia, foram pesadas 25 g da amostra em 225 ml de água peptonada 0,1% (p/v) estéril e homogeneizado por

20 minutos, obtendo-se assim a primeira diluição (10^{-1}). A partir desta diluição foram realizadas as demais diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) até a diluição 10^{-5} .

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

4.2 Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas

Para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias mesófilas, e a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias para bactérias psicrotróficas. 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 das diluições 10^1 , 10^2 e 10^3 em uma série de 3 tubos de ensaio contendo caldo lactosado (lactose

0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v)) e tubos de Durham invertidos e a incubou-se a 37°C durante 24 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais (FENG et al., 2002).

Alíquotas dos tubos positivos no caldo lactosado foram transferidas, simultaneamente, para caldo verde brilhante bile lactose 2% (para a confirmação de coliformes totais) e para caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e tubos de Durham invertidos foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais. Os tubos contendo caldo *Escherichia coli* e tubos de Durham invertidos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes. Através da Tabela 1 foi obtido o NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por grama da amostra (NMP/g) (FENG et al., 2002).

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

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

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

4.4 Pesquisa de Salmonella spp.

Para a pesquisa de Salmonella sp., a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada à 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação, alíquotas de 1 ml foram transferidas para caldo selenito-cistina e incubadas a 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de

cada tubo, semeou-se em estrias para isolamento, placas de Petri contendo o meio ágar *Salmonella Shigella* (Ágar SS).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em ágar *Salmonella Shigella* para obtenção de colônias puras e então estas foram inoculadas pelo método de profundidade em tubos com 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 2). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de H_2S como *Salmonella* (ANVISA, 2010). As colônias suspeitas foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

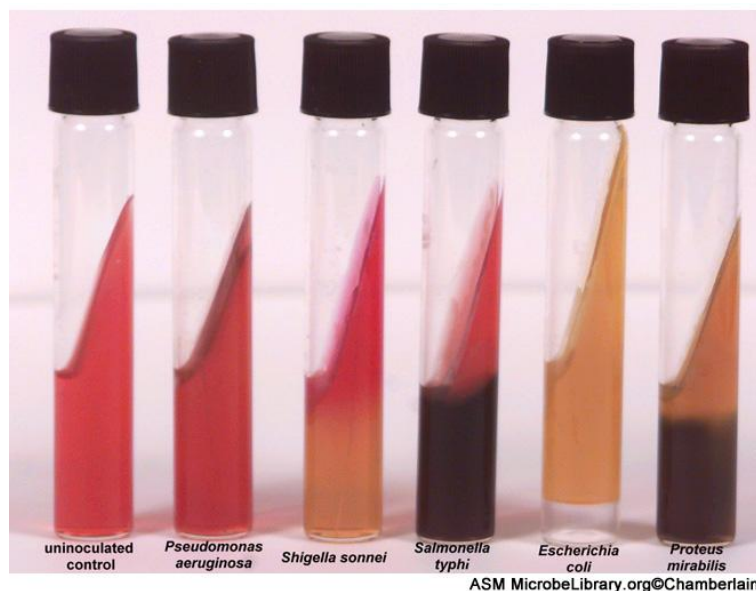


Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).

4.5 Contagem de *Staphylococcus spp.*

Para a contagem de *Staphylococcus sp.*, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Ágar PCA suplementado com cloreto de sódio 7,5% (p/v) e incubadas a 37°C por 48 h. Ao meio de cultivo foi ainda adicionado 500 UI do antifúngico nistatina por mililitro de meio de cultivo, devido à grande proliferação de fungos que prejudicavam a análise e contagem. Após incubação, as colônias isoladas foram semeadas em ágar Sal Manitol e incubadas em 37°C por 48h. As colônias fermentadoras de manitol foram contadas e posteriormente coradas pelo método de Gram. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

4.6 Análises moleculares e extração de DNA bacteriano

Antes de iniciar a extração foi feito a preparação das soluções reagentes (colocou-se em banho-maria à 50°C o tampão AW), materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas das amostras de vegetais minimamente processados suspeitas de serem patogênicas e cultivadas por 12 h em caldo LB.

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), com adaptações, descritas a seguir:

Adicionou-se 9,0 mL da amostra (em caldo LB) no tubo cônico tipo falcon de 15 mL, centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm, e descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o sedimento). Foram adicionados 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão CF (tampão de lise celular- pré aquecido a 65°C), encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função impedir a formação de grumos celulares). Após isso, os tubos foram homogeneizados em “vortex”, até a completa homogeneização da solução. As amostras foram incubada em banho maria a 65°C, por 30 minutos.

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

Por conseguinte, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica (fornecidos pelo kit), transferiu-se o sobrenadante para o filtro e centrifugou-se por 1 minuto, 15000 rpm. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-se 400 µL do tampão CQW e centrifugou-se por 1 minuto, 15000 rpm. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 700 µL do tampão C5, centrifugou-se por 1 minuto, 15000 rpm e descartou-se o filtrado (os tampões CQW e C5 contém isotiocianato de guanidina, em concentrações decrescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e retirada das outras biomoléculas da amostra. Também contém etanol, para facilitar a precipitação). Por fim, foi feita outra centrifugação com o tubo vazio, por 1 minuto, 15000 rpm.

Após isto, o filtro foi trocado para outro tipo eppendorf de 1,5 mL definitivo, onde foi adicionado 100 µL do tampão Elution Buffer CE (este tampão favorece a eluição do DNA), pré aquecido a 70°C. Após uma pré incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto, 15000 rpm e descartou-se o filtro e as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

4.7 Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões gênicas a serem analisadas para *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* ssp. foi realizada conforme busca na literatura e optou-se por três regiões gênicas específicas, para os quais os oligonucleotídeos foram redesenhados no presente estudo, como descrito a seguir:

- EutC: anotação descrita para o gene codante da Etanolamina amônia liase em *E. coli*

Esta enzima pertence as vias dependentes de vitamina B12 em bactérias. A utilização de etanolamina como fonte única de carbono e energia requer vitamina B12 para ambas as funções: indutor da via catabólica e cofator da enzima etanolamina amônia liase. Etanolamina amônia liase é a primeira enzima da via que converte etanolamina a acetaldeído e amônia; acetaldeído serve como fonte de carbono e energia ao ser convertido em acetil-coA e a amônia serve como fonte de nitrogênio. A etanolamina é facilmente encontrada na natureza, pois está presente nos fosfolipídios das membranas celulares como a fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (PAIVA, 2010). Nossa sequência é específica para detecção de *E. coli*, porém referenciado na literatura como região promotora do gene *malB* (sistema de maltose) por Wang e colaboradores em 1997 e adotado para identificar qualquer sorotipo desta espécie. Adotamos aqui a anotação fornecida pelo GeneBank em 2012.

- entC: anotação descrita para o gene que codifica enterotoxina C do *S. aureus*

O gene entC mostrou correlação forte com a produção de enterotoxina e foi proposto para estudo por Tamarapu e colaboradores em 2001.

As enterotoxinas estafilocócicas são consideradas superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação, ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções hepáticas e renais. O grupo da toxina C (SEC) é formado por três subtipos antigenicamente distintos e denominados de SEC1, SEC2 e SEC. A enterotoxina C é heterogênea e apresenta variações antigênicas e em sua sequência molecular, ocorrendo ainda, as variantes

SEC bovina e SEC ovina, cuja classificação é baseada em diferenças antigênicas e no animal hospedeiro da qual foi isolada.

- *invA*: anotação descrita para o gene que codifica proteínas relacionadas com invasão celular de *Salmonella enterica*

As ilhas de patogenicidade de *Salmonella sp.* (*Salmonella Patogenicity Island*, SPI) são grandes regiões do cromossomo (10 a mais de 100 Kb) que codificam vários fatores de virulência. Estas ilhas estão ausentes em estirpes não patogênicas da mesma espécie, apresentam conteúdo de guanidina e citosina (G+C) diferente do restante do cromossomo e frequentemente estão localizadas adjacentes a genes que codificam RNA transportador. Ao todo já foram descritas 17 SPIs, algumas são conservadas para o gênero enquanto outras são específicas para determinados sorotipos, como exemplo, SPI-1 está presente em *Salmonella bongori* e em todas as subespécies e sorotipos de *Salmonella enterica*. Já a ilha SPI-7 é específica para os sorovares *Typhi*, *Dublin* e *Paratyphi C*. Na SPI-1 estão localizados genes necessários para invasão, característica importante para virulência de *Salmonella enterica*. Dentre as ilhas de patogenicidade SPI – 1 é a melhor caracterizada. O operon *Inv* (*invasibility*) presente na SPI-1 é composto de sete genes *invABCDEFG*. O gene *invA* é o primeiro no operon, e desempenha função importante na invasão de células epiteliais. Sorotipos de *Salmonella enterica* que não possuem o gene *invA* são incapazes de expressar os genes *invABC*, tornando-os impossibilitados de invadir células de mamíferos. Por isso, o gene *invA* parece ser bastante conservado em todos os sorovares de *Salmonella*, sendo o gene utilizado para sua detecção pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (revisado por De Oliveira e colaboradores, 2013).

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

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

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

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

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

Oligonucleotídeo	Sequência (5' → 3')	Produto estimado	Espécie
entC_F	TTTTACACCCAACGTATTAGCAGA	401 pb	<i>S. aureus</i>
entC_R	TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
EutC_F	TCTATGGGCTGTGACTGCTG	113 pb	<i>E. coli</i>
EutC_R	GGCATCCCCATGATGTAGTT		
invA_F	GCTGATGCCGGTGAAATTAT	445 pb	<i>Salmonella enterica</i> <i>subsp. enterica</i>
invA_R	CGACAAGACCATCACCAATG		

4.8 PCR qualitativo

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

Foram utilizados, para cada reação de PCR: 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o de 100pb ou de 50pb DNAI/HindIII (JENA[®]).

4.9 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de extração do DNA e PCR foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel é de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no começo foi usada 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 etídeo (sua função é de corar o gel e permitir a visualização do DNA, quando colocado à luz ultravioleta).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas

Os resultados encontrados nas análises realizadas para contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas em amostras de vegetais minimamente processados foram expressos na tabela 4. Houve um grande crescimento microbiano em todas as amostras, de modo que somente foi possível fazer a contagem nas placas com diluições entre 10^{-3} e 10^{-5} . Foram preferencialmente escolhidas placas de mesma diluição para obtenção de média de unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g), log e desvio padrão.

Tabela 4. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas nas amostras de vegetais minimamente processados

Amostras	Bactérias mesófilas		Bactérias psicotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g \pm DP	UFC/g	Log UFC/g \pm DP
Amostra 1	$1,4 \times 10^7$	$7,13 \pm 0,15$	$1,0 \times 10^5$	$4,90 \pm 0,34$
Amostra 2	$1,2 \times 10^8$	$8,08 \pm 0,19$	$1,5 \times 10^6$	$6,17 \pm 0,18$
Amostra 3	$1,2 \times 10^7$	$6,99 \pm 0,37$	$4,0 \times 10^7$	$7,50 \pm 0,37$
Amostra 4	$5,6 \times 10^6$	$6,33 \pm 0,90$	$1,0 \times 10^6$	$5,97 \pm 0,17$
Amostra 5	$1,5 \times 10^7$	$7,17 \pm 0,11$	$2,7 \times 10^5$	$5,41 \pm 0,17$
Amostra 6	$6,4 \times 10^6$	$6,80 \pm 0,06$	$4,7 \times 10^6$	$6,65 \pm 0,15$
Amostra 7	$7,2 \times 10^6$	$6,79 \pm 0,30$	$1,5 \times 10^7$	$7,18 \pm 0,12$
Amostra 8	$1,4 \times 10^6$	$6,09 \pm 0,30$	$6,0 \times 10^6$	$6,77 \pm 0,02$
Amostra 9	$7,0 \times 10^6$	$6,31 \pm 0,47$	$1,2 \times 10^8$	$8,06 \pm 0,08$
Amostra 10	$9,6 \times 10^5$	$5,81 \pm 0,46$	$4,0 \times 10^6$	$6,65 \pm 0,09$
Amostra 11	$7,1 \times 10^7$	$7,82 \pm 0,15$	$3,0 \times 10^7$	$7,43 \pm 0,26$
Amostra 12	$5,5 \times 10^7$	$7,17 \pm 0,34$	$3,1 \times 10^7$	$7,45 \pm 0,24$
Amostra 13	$1,5 \times 10^7$	$6,99 \pm 0,59$	$4,8 \times 10^7$	$7,43 \pm 0,54$

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

Das treze amostras analisadas, foi observada uma contagem total de bactérias (mesófilas e/ou psicotróficas) acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g em nove amostras (69,2%). Pelos padrões estabelecidos pelo ICMSF (2002), permite-se uma contagem máxima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g de microrganismos totais para os alimentos em geral. Após sanitização dos vegetais é esperado uma redução da carga microbiana para pelo menos 10^5 UFC/g (ICMSF, 2002). A presença de microrganismos tanto mesófilos quanto psicotróficos com contagem superior a $1,0 \times 10^7$ UFC/g indica falta de qualidade higiênico-sanitária dos alimentos. Porém, em termos de legislação brasileira (Brasil, 2001) não há um limite preconizado para contagem total de microrganismos em alimentos, de modo que não se pode condenar o consumo legalmente.

Esse número elevado de microrganismos totais nos vegetais minimamente processados pode ser proveniente da microbiota original, da falta de Boas Práticas de Fabricação e higiene no processamento na indústria ou ainda do abuso da temperatura durante o armazenamento (Goodburn & Wallace, 2012; Oliveira et al., 2011). Segundo Beuchat et al. (2004), a qualidade inicial da matéria prima é importante, pois a sanitização, no geral, reduz a quantidade de microrganismos em apenas 100 vezes. Em um estudo realizado por Marques et al. (2016), avaliou-se a qualidade inicial de hortaliças frescas como alface, couve e repolho comercializadas nos supermercados de Brasília após o processo de sanitização com solução de hipoclorito de sódio. Os resultados mostraram que o processo de sanitização foi eficiente, sendo que todas as amostras sanitizadas apresentaram baixa contagem de bactérias mesófilas (entre 10^3 e 10^5) e psicotróficas (entre 10^1 e 10^3), além de não apresentarem bactérias transmitidas por alimentos potencialmente patogênicas como *Salmonella* sp. e *S. aureus*.

O excessivo tempo de armazenamento desses alimentos perecíveis em temperaturas abusivas é outro ponto possível de aumento na carga bacteriana. O abuso da temperatura leva a uma rápida proliferação das bactérias mesófilas as quais apresentam aumento da taxa de crescimento a 12°C , levando a deterioração precoce dos produtos (Cenci, 2011). Em um estudo realizado por Allende et al. (2004), com vegetais minimamente processados armazenados na temperatura correta de 5°C , observou-se um aumento da carga bacteriana de $1,0 \times 10^5$ (carga inicial) para $1,0 \times 10^8$ UFC/g após sete dias de armazenamento. Em outro estudo realizado por Lopez et al. (2003), também foi observado um aumento na contagem

de mesófilos com o tempo de armazenamento, com variações de 10^5 para 10^8 UFC/g em amostras de cebola e de 10^6 para 10^9 UFC/g e em amostras de repolho, ambas minimamente processadas.

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

A tabela 5 apresenta os resultados da determinação do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de vegetais minimamente processados analisadas neste estudo.

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

Amostras	Coliformes Totais		Coliformes termotolerantes	
	NMP/g	Log NMP/g \pm DP	NMP/g	Log NMP/g \pm DP
Amostra 1	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$1,6 \times 10^2$	$1,66 \pm 0,76$
Amostra 2	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$5,0 \times 10^2$	$2,52 \pm 0,39$
Amostra 3	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$1,4 \times 10^1$	$0,93 \pm 0,44$
Amostra 4	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$
Amostra 5	$4,7 \times 10^2$	$2,35 \pm 0,75$	$0,8 \times 10^1$	$1,01 \pm 0,03$
Amostra 6	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$5,0 \times 10^1$	$1,58 \pm 0,32$
Amostra 7	$5,2 \times 10^2$	$2,38 \pm 0,83$	$3,8 \times 10^2$	$2,38 \pm 0,68$
Amostra 8	$2,3 \times 10^2$	$2,02 \pm 0,86$	$1,0 \times 10^1$	$1,00 \pm 0,15$
Amostra 9	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$7,7 \times 10^1$	$1,36 \pm 0,75$
Amostra 10	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$1,5 \times 10^1$	$1,17 \pm 0,11$
Amostra 11	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$1,5 \times 10^1$	$1,17 \pm 0,10$
Amostra 12	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$5,3 \times 10^2$	$2,41 \pm 0,63$
Amostra 13	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,01$	$2,1 \times 10^2$	$2,19 \pm 0,32$

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

Nas análises realizadas neste trabalho, dez das treze amostras (76,9%) de vegetais minimamente processados apresentaram elevada quantidade de coliformes totais, com enumeração acima de $1,0 \times 10^3$ NMP/g. Segundo Maffei et al. (2013), os

vegetais frescos apresentam uma alta quantidade de coliformes totais como microbiota inicial vinda do solo, contudo é esperado que essa quantidade seja reduzida após processo de sanitização. Esse número elevado de coliformes totais nos vegetais minimamente processados indicou falta de qualidade higiênico-sanitária dos alimentos. Porém, em termos de legislação brasileira (Brasil, 2001) não há um limite preconizado para coliformes totais em alimentos, de modo que não se pode condenar o consumo legalmente.

No Brasil, o limite aceitável para coliformes termotolerantes (a 45 °C) é de $1,0 \times 10^2$ NMP/g em hortaliças frescas, "in natura", preparadas (descascadas ou selecionadas ou fracionadas) sanificadas, refrigeradas ou congeladas, para consumo direto (Brasil, 2001). Assim, considerando a legislação vigente, das treze amostras analisadas, seis amostras (46,1%) estavam impróprias para o consumo, com excesso de coliformes termotolerantes.

Os níveis de coliformes termotolerantes são considerados um indicador de contaminação fecal, pois é presumível que sua população seja composta majoritariamente de *E. coli*, que tem como origem o intestino de humanos e animais. E ainda um elevado número de coliformes termotolerantes é indicativo da possível presença de outros microrganismos entéricos patogênicos como *Shigella* e *Salmonella* (Paula et al., 2009).

O elevado número de coliformes termotolerantes nos vegetais minimamente processados pode ser proveniente da microbiota original. Segundo Sivapalasingam et al. (2004), o uso de sementes contaminadas com fezes de animais durante o armazenamento ou plantio é uma das causas prováveis de contaminação. Outra possibilidade é o uso de canais de irrigação com água de baixa qualidade microbiológica, contato com fezes de gado ou mesmo animais selvagens e o uso de fertilizantes a base de fezes não compostadas (Sivapalasingam et al., 2004).

Contudo, no estudo de Marques et al. (2016), a avaliação de hortaliças frescas comercializadas nos supermercados de Brasília lavadas somente em água corrente e após o processo de sanitização com solução de hipoclorito de sódio, mostrou que todas as amostras (sanitizadas ou não) apresentaram baixa enumeração de coliformes totais variando de 10^1 a 10^2 NMP/g e baixa enumeração de coliformes termotolerantes (entre 0,2 e $6,5 \times 10^1$ NMP/g), indicando uma boa qualidade da matéria prima.

Estudos epidemiológicos que relacionam surtos de doenças transmitidas por alimentos ao consumo de produtos frescos indicam que a maioria dos patógenos era proveniente de contaminação fecal direta ou indireta. Assim, a determinação de coliformes termotolerantes pode ser considerada um bom indicador de higiene, principalmente para contaminação fecal. Taxas de *E. coli* são comumente usadas para monitorar as condições sanitárias em que os alimentos são processados (Balagué et al., 2006; Nguz et al., 2005).

5.3. Determinação da presença de *Salmonella* sp.

Foi detectada a presença de *Salmonella* sp. em três das amostras analisadas: amostra 9 da marca 6 composta de vagem fatiada; amostra 12 da marca 1 composta de couve fatiada e amostra 13 da marca 2 composta de couve fatiada. Este resultado correspondeu a 23% do total de amostras analisadas. De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2001) é inaceitável a presença de *Salmonella* em vegetais prontos para comer. Assim, as amostras 9, 12 e 13 estavam impróprias para o consumo, lembrando que as amostras 12 e 13 já tinham sido reprovadas para o consumo pelo excesso de coliformes termotolerantes.

Salmonella é comumente encontrada no trato gastrointestinal de diversos animais como pássaros, répteis, bovinos e humanos, e tem sido demonstrado que pode sobreviver e crescer em uma grande variedade de produtos. O contato com pássaros e roedores durante o armazenamento e/ou transporte dos vegetais é uma possível fonte de contaminação, ou ainda em algumas fazendas as sementes podem estar plantadas em locais onde animais pastam livremente, podendo ser contaminadas por suas fezes. Devido à capacidade da *Salmonella* de sobreviver por meses nas sementes e se proliferar durante o brotamento, uma pequena quantidade de sementes contaminadas já pode ser considerado um risco, pois o crescimento deste patógeno em condições ideais pode ser maior que $1,0 \times 10^4$ UFC em 48 horas (Hanning, Nutt & Ricke, 2009).

Salmonella é um dos principais patógenos causadores de doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos. Foi estimado que 1,4 milhões de casos de salmonelose aconteceram em 2007 com o custo de 2,5 bilhões de dólares em perda de produtividade e despesas médicas. A maioria dos casos de salmonelose é precipitadamente atribuída ao consumo de aves ou produtos avícolas

contaminados. Porém houve um aumento dos casos de surtos de doenças bacterianas relacionadas ao consumo de vegetais minimamente processados, onde *Salmonella sp.* era um dos principais contaminantes (Hanning, Nutt & Ricke, 2009).

Em uma revisão feita por Sivapalasingam et al. (2004) nos Estados Unidos, os dados epidemiológicos de surtos de doenças transmitidas por alimentos entre 1973 e 1997, mostraram que de 62 casos relacionados com agentes bacterianos, 31 casos (48%) foram identificados como *Salmonella sp.* Entre 1995 e 2003, dez surtos de salmonelose ocorreram nos Estados Unidos devido a vegetais contaminados. Dois grandes surtos em 1995 e 1996 tiveram como fonte de *Salmonella* brotos de alfafa, onde mais de 700 pessoas foram acometidas e uma chegou a óbito (Hanning, Nutt & Ricke, 2009).

Algumas práticas agrícolas específicas como o uso de esterco animal em lugar de fertilizantes químicos podem ser procedimentos que introduzem esse tipo de microorganismo em produtos frescos. E ainda, o uso de água contaminada para a irrigação é um possível veículo para transmissão de *Salmonella* para a superfície de frutas e hortaliças. As indústrias de produção de vegetais minimamente processados tem um desafio maior para diminuir a contaminação por patógenos quando comparada com outros tipos de indústrias de alimentos, pois os seus produtos são na maioria das vezes consumidos crus (Hanning, Nutt & Ricke, 2009).

5.4 Contagem de *Staphylococcus sp.*

Um importante patógeno transmitido por alimentos é o *Staphylococcus aureus*, capaz de causar doenças em humanos e animais. As doenças desencadeadas por esta bactéria vão desde simples infecções de pele até doenças graves como pneumonia e septicemia. Entre os alimentos relacionados com intoxicação estafilocócica, os mais manipulados se destacam e frequentemente são isoladas cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* nesses tipos de alimentos (Seo, Jang & Moon, 2010).

Das amostras coletadas neste trabalho, detectou-se a presença de *Staphylococcus aureus* em seis de um total de treze amostras analisadas, correspondendo a 46,1% das amostras. Os resultados estão expressos na tabela 6.

Tabela 6. Contagem das colônias de *Staphylococcus aureus* (colônias fermentadoras de manitol e após coloração de gram) nas amostras de vegetais minimamente processados

<i>Staphylococcus aureus</i>		
Amostras	UFC/g	Log média ± DP
Amostra 1	$2,0 \times 10^2$	$2,25 \pm 0,23$
Amostra 2	ND	ND
Amostra 3	$6,6 \times 10^2$	$2,77 \pm 0,27$
Amostra 4	$3,3 \times 10^2$	$2,50 \pm 0,17$
Amostra 5	$8,0 \times 10^2$	$2,89 \pm 0,05$
Amostra 6	ND	ND
Amostra 7	$5,5 \times 10^2$	$2,72 \pm 0,16$
Amostra 8	ND	ND
Amostra 9	$3,5 \times 10^3$	$3,49 \pm 0,27$
Amostra 10	ND	ND
Amostra 11	ND	ND
Amostra 12	ND	ND
Amostra 13	ND	ND

ND = NÃO DETECTADO

O *Staphylococcus aureus* habita a nasofaringe humana e assim tem grande acesso as mãos do hospedeiro para então contaminar os alimentos. A falta de higiene do manipulador infectado pode facilmente contaminar o alimento. O patógeno está presente em 30% da população humana, onde um a dois terços destes possuem cepas enterotoxigênicas produtoras de toxina proteica termoestável. As enterotoxinas estafilocócicas têm a capacidade de se manterem ativas em certos alimentos mesmo após passarem por processamento térmico, pois graças a sua termoestabilidade conseguem resistir a uma temperatura de 100°C por 30 minutos (Bennett, 2005, Franco e Landgraf, 2008). Segundo Franco e Landgraf (2008) é necessário que a população de *Staphylococcus aureus* seja de pelo menos 10^5 UFC/g no alimento para que haja a formação da toxina em níveis capazes de causar intoxicação alimentar.

A legislação brasileira (Brasil, 2001) estabelece o valor limite de $1,0 \times 10^3$ UFC/g para contagem de *Staphylococcus aureus* nas saladas prontas para o consumo. Nos resultados deste estudo, a amostra 9 (vagem fatiada), que já tinha sido considerada imprópria para o consumo pela presença de *Salmonella*, também estava com contagem de *S. aureus* acima do limite permitido na legislação. A presença de *S. aureus* em números inferiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/g nas outras cinco amostras indicou falha no processamento ou condições de higiene inadequadas. Assim, infere-se que os manipuladores não usaram luvas durante a produção e não efetuaram a correta assepsia das mãos, resultando em contaminação do produto final.

A intoxicação alimentar estafilocócica depende da quantidade de toxina produzida pelo microrganismo durante a fase de proliferação no alimento. Os sintomas costumam aparecer entre 1 a 6 horas após a ingestão de alimentos contaminados, a depender das características individuais do hospedeiro e dos níveis de toxina ingerida. Os sintomas clínicos geralmente desaparecem ao fim de 24 a 48 horas após seu início e mortes são raras, mas é um risco potencial para crianças ou idosos. Este tipo de intoxicação alimentar é uma das mais comuns, pois *S. aureus* é uma bactéria muito recorrente e diversas cepas apresentam habilidade de produzir enterotoxinas (Seo, Jang & Moon, 2010).

Staphylococcus aureus tem demonstrado frequentemente padrões de resistência a antibacterianos comumente usados em protocolos terapêuticos, o que é um problema importante de saúde pública em muitos países devido à circulação constante de cepas resistentes e à possível contaminação de alimentos e água (Seo, Jang & Moon, 2010). No estudo realizado por Seo, Jang & Moon em 2010 na Coreia, a maioria das estirpes de *S. aureus* (96%) isoladas de amostras de saladas, brotos, frutas e cebolas apresentavam resistência a pelo menos um dos antibióticos testados como penicilina, eritromicina, ampicilina entre outros. Este é um dado importante, pois sugere que grande parte das cepas podem ser resistentes aos antibióticos comuns, sendo assim, um fator preocupante.

5.5 Análises moleculares

No presente estudo, algumas colônias suspeitas de serem *E. coli* provenientes das amostras, após as análises moleculares, foram geneticamente confirmadas como *E. coli* (Figura 3). As colônias suspeitas de serem *S. aureus* também foram geneticamente confirmadas como *S. aureus* produtora de enterotoxina C (Figura 4). Além disto, três colônias de bactérias isoladas suspeitas de serem *Salmonella* foram testadas e após as análises moleculares foram geneticamente confirmadas como *Salmonella enterica* (Figura 5). A Tabela 7 apresenta a identificação das colônias isoladas por meio de PCR e as amostras de onde essas bactérias foram isoladas.

Tabela 7. Identificação por meio de PCR de algumas bactérias isoladas de amostras de vegetais minimamente processados comercializados em Brasília-DF

Número da colônia	Amostra	Resultado molecular	Figura
MA12	7	<i>Escherichia coli</i> +	3
MA13	8	<i>Escherichia coli</i> +	
MA22	12	<i>Escherichia coli</i> +	
MA23	2	<i>Escherichia coli</i> +	
MA26	5	<i>Escherichia coli</i> +	
M0	1	<i>Escherichia coli</i> +	
MA51	13	<i>Escherichia coli</i> +	
MA52	13	<i>Escherichia coli</i> +	
MA54	10	<i>Escherichia coli</i> +	
CP	<i>E. coli</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> +	
CN	Controle negativo	<i>Escherichia coli</i> -	
CN	Controle negativo	<i>S. aureus</i> -	4
CP	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i> +	
MA1	4	<i>S. aureus</i> +	
MA2	9	<i>S. aureus</i> +	
MA3	1	<i>S. aureus</i> +	
MA4	5	<i>S. aureus</i> +	
MA5	9	<i>S. aureus</i> +	
MA6	3	<i>S. aureus</i> +	
MA7	4	<i>S. aureus</i> +	
MA8	3	<i>S. aureus</i> +	
MA9	9	<i>S. aureus</i> +	
MA10	5	<i>S. aureus</i> +	
MA40	7	<i>S. aureus</i> +	
CN	Controle negativo	<i>Salmonella enterica</i> -	5
CP	<i>Salmonella</i> ATCC 14028	<i>Salmonella enterica</i> +	
MA2	12	<i>Salmonella enterica</i> +	
MA8	13	<i>Salmonella enterica</i> +	
MA15	9	<i>Salmonella enterica</i> +	

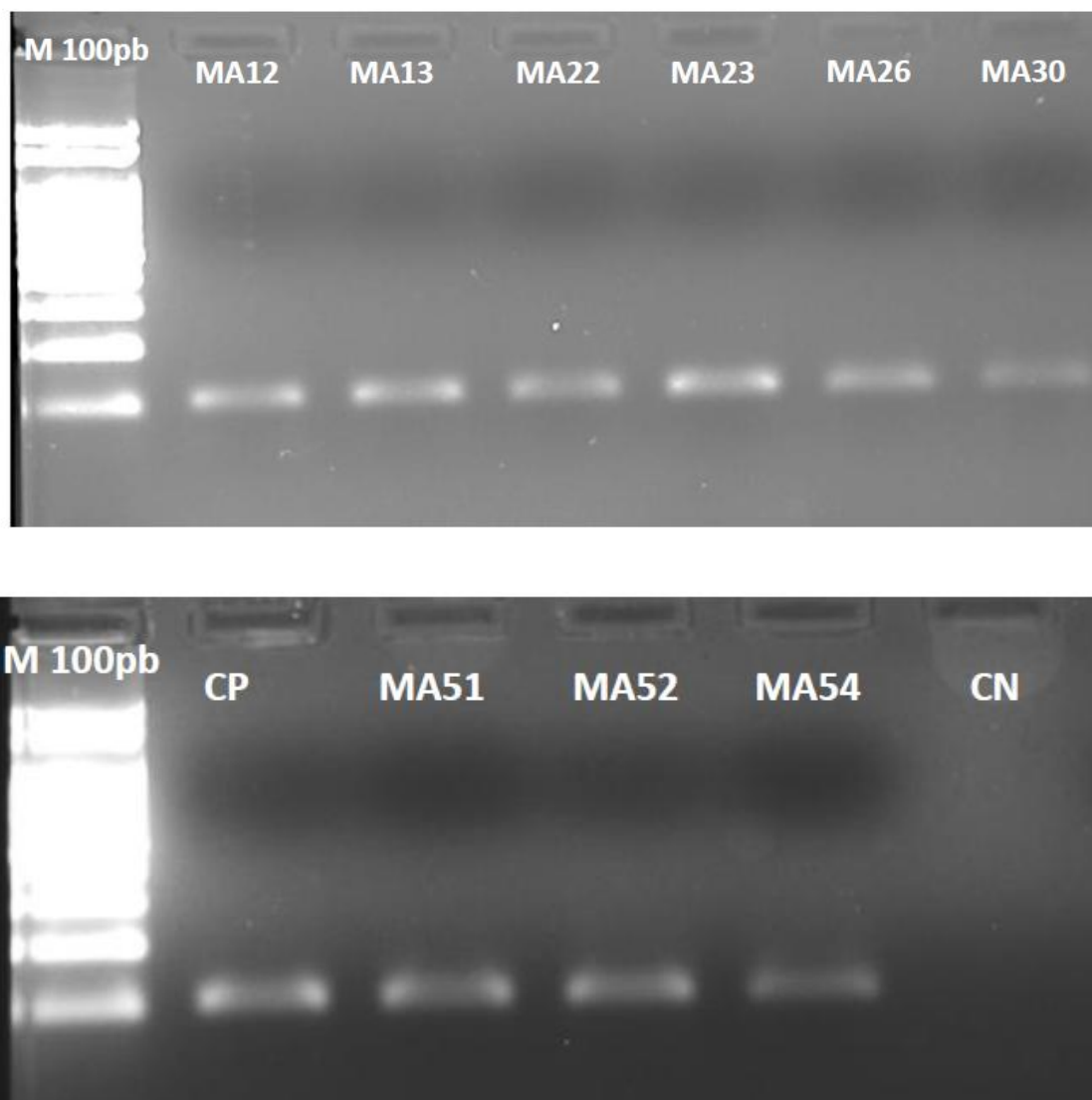


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *EutC* de *E. coli*. 100pb = marcador de 100 pb; MA12 a MA54 = amostras deste estudo com amplicons de *EutC* (113 pb); CN = Controle Negativo; CP= Controle positivo ATCC 29213.

Foi observado que das 13 amostras de vegetais minimamente processados analisadas, 8 amostras (61,5%) tiveram cepas de *E. coli* confirmadas por PCR. As amostras 5, 8 e 10 apesar de apresentarem cepas de *E. coli*, estavam dentro dos limites aceitáveis de coliformes termotolerantes estabelecidos pela legislação. Já as amostras 1, 2, 7, 12 e 13 estavam impróprias para o consumo.

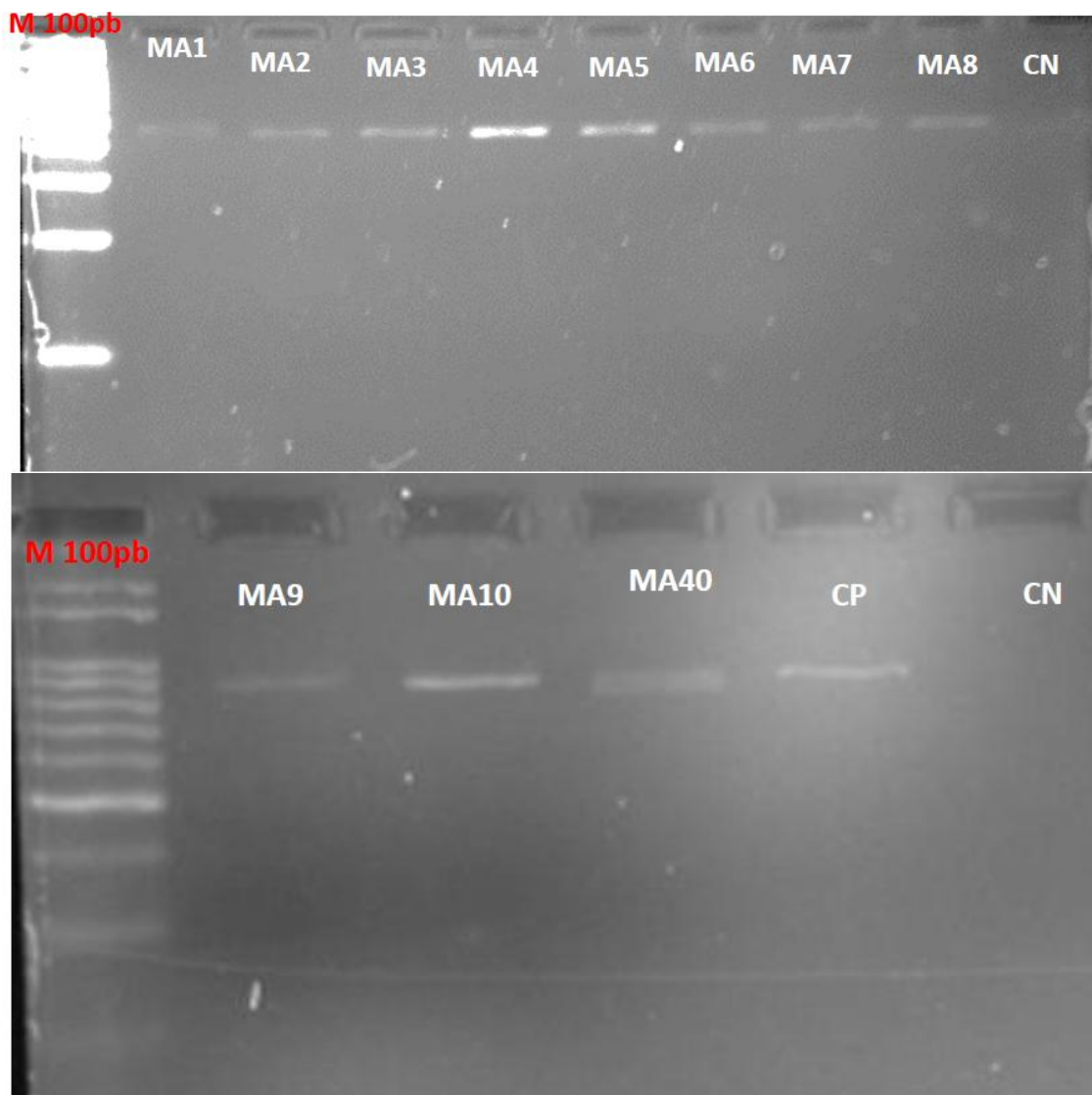


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *entC* de *S. aureus*. 100pb = marcador de 100 pb; MA1 a MA40 = amostras deste estudo com amplicons de *entC* (401 pb); CP= controle positivo ATCC 33862; CN = Controle Negativo.

Foi observado que das 13 amostras de vegetais minimamente processados analisadas, 6 amostras (46,2%) tiveram cepas de *S. aureus* confirmadas por PCR. As amostras 1, 3, 4, 5 e 7 apesar de apresentarem cepas de *S. aureus*, estavam dentro dos limites aceitáveis pela legislação. Já a amostra 9 apresentou contagens de *S. aureus* acima do permitido pela legislação brasileira e seu consumo representaria risco à saúde do consumidor, pois a região genica *EntC* identificada nessas bactérias indicou que essas cepas eram produtoras de enterotoxinas.

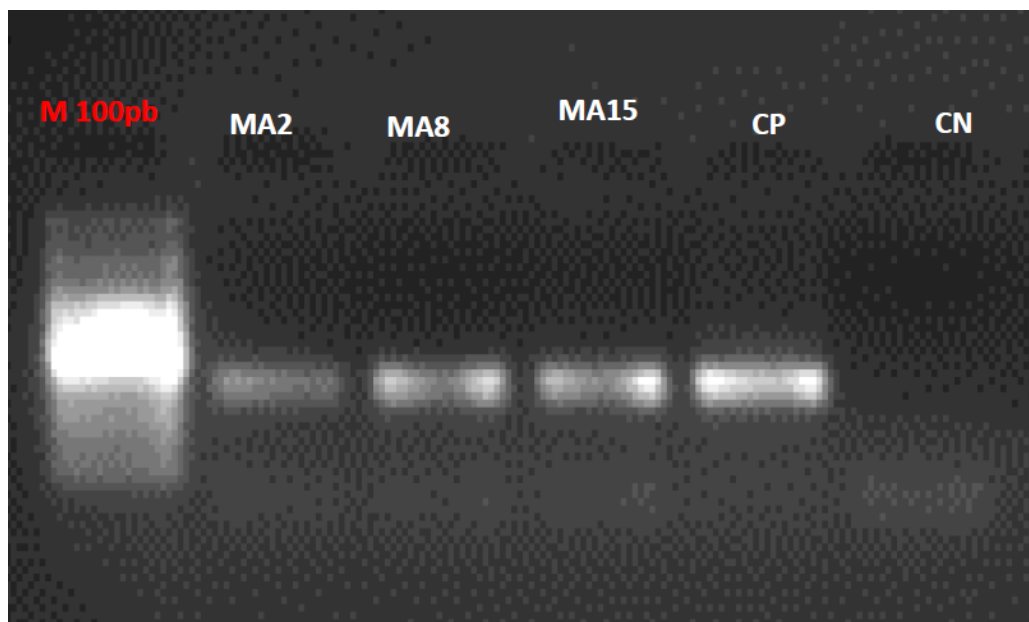


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *invA* de *Salmonella enterica* M = marcador de 100 pb; MA2 a MA15 = amostras deste estudo com amplicons de de *invA* (445 pb) CP= controle positivo ATCC 14028; CN = Controle Negativo.

Foi observado que das 13 amostras de vegetais minimamente processados analisadas, 3 amostras (23%) tiveram cepas de *Salmonella enterica* confirmadas por PCR. De acordo com a legislação brasileira (Brasil, 2001) é inaceitável a presença de *Salmonella* em vegetais prontos para comer. Assim, as amostras 9, 12 e 13 estavam impróprias para o consumo, lembrando que as amostras 12 e 13 já tinham sido reprovadas para o consumo pelo excesso de coliformes termotolerantes.

5.6 Análise geral

Ao analisar as amostras dos vegetais minimamente processados como um todo é possível observar qual amostra se encontrou em condições aceitáveis para o consumo e qual amostra estava reprovada devido à baixa qualidade microbiológica, como mostrado na tabela 8. Das treze amostras analisadas neste estudo, sete amostras estavam reprovadas para o consumo humano e seis amostras foram consideradas satisfatórias para o consumo, pois apresentaram elevada quantidade de bactérias mesófilas ou psicrotróficas ou coliformes totais e/ou *S. aureus*, além da presença de *E. coli* confirmada por PCR.

As amostras 6 e 8 podem ser consideradas as de melhor qualidade microbiológica se comparadas com as outras amostras deste estudo, apesar de terem apresentado elevada quantidade de coliformes totais (amostra 6) e *E. coli* na PCR (amostra 8). Já as amostras 9, 12 e 13 podem ser consideradas as de maior risco microbiológico para consumo, pois continham a presença associada de bactérias patogênicas como *Salmonella* e altas contagens de coliformes termotolerantes e *S. aureus*.

Tabela 8. Classificação das amostras de vegetais minimamente processados em aprovadas, satisfatórias e reprovadas para consumo humano.

Amostras	Composição e marca	Microrganismos encontrados em quantidade significativa	Microrganismos encontrados acima do permitido pela legislação	A/R/S
1	Mistura para yakissoba (marca 1)	Bactérias mesófilas, psicotróficas, coliformes totais e <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> na PCR	Coliformes termotolerantes	R
2	Salada de alface, rúcula, cenoura fatiada e tomate (marca 2)	Bactérias mesófilas e coliformes totais; <i>E. coli</i> na PCR	Coliformes termotolerantes	R
3	Salada de alface, tomate, milho, queijo e cogumelo (marca 3)	Bactérias mesófilas, psicotróficas, coliformes totais e <i>S. aureus</i> .	-----	S
4	Salada de alface, agrião e cenoura (marca 1)	Coliformes totais e <i>S. aureus</i> .	Coliformes termotolerantes	R
5	Salada de cenoura, repolho verde e repolho roxo (marca 4)	Bactérias mesófilas e <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> na PCR	-----	S
6	Broto de alfafa (marca 5)	Coliformes totais	-----	S
7	Couve fatiada (marca 6)	Bactérias psicotróficas e <i>S. aureus</i> ; <i>E. coli</i> na PCR	Coliformes termotolerantes	R
8	Salada de alface (marca 7)	<i>E. coli</i> na PCR	-----	S
9	Vagem fatiada (marca 6)	Bactérias psicotróficas e coliformes totais	<i>Salmonella</i> e <i>S. aureus</i>	R
10	Couve fatiada (marca 8)	Coliformes totais; <i>E. coli</i> na PCR	-----	S
11	Mistura para yakissoba (marca 1)	Bactérias mesófilas, psicotróficas e coliformes totais	-----	S
12	Couve fatiada (marca 1)	Bactérias mesófilas, psicotróficas e coliformes totais; <i>E. coli</i> na PCR	Coliformes termotolerantes e <i>Salmonella</i>	R
13	Couve fatiada (marca 2)	Bactérias mesófilas, psicotróficas e coliformes totais; <i>E. coli</i> na PCR	Coliformes termotolerantes e <i>Salmonella</i>	R
A= aprovada; S = satisfatória; R= reprovada				

6. CONCLUSÕES

Após a realização das análises deste estudo, das treze amostras de vegetais minimamente processados coletadas, sete amostras (53,8%) estavam impróprias para o consumo humano de acordo com a legislação brasileira. Seis amostras foram reprovadas pela presença de coliformes termotolerantes acima do permitido ($>1,0 \times 10^2$ NMP/g). Destas, duas amostras continham além de coliformes termotolerantes em excesso, a bactéria patogênica *Salmonella*, microrganismo que deve estar ausente em alimentos prontos para consumo. E a sétima amostra reprovada continha a presença de *S. aureus* em quantidade superior à permitida pela legislação ($>1,0 \times 10^3$ UFC/g) e *Salmonella*.

Detectou-se a presença de *S. aureus* em seis amostras (46,1%) de um total de treze amostras analisadas. Apesar de a quantidade de colônias *S. aureus* estar dentro do permitido pela legislação em cinco amostras, a presença destas bactérias é um indicativo de condições precárias de higiene no processamento, devido ao fato de ser uma bactéria procedente principalmente da orofaringe humana.

Houve ainda uma contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas elevada em nove amostras (69,2%) com enumeração acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g. Esta alta contagem microbiana pode estar associada à microbiota original destes alimentos, ou ainda pode ser resultado de falhas no processamento onde pode ocorrer contaminações e/ou quebra da cadeia do frio e conseqüente crescimento exacerbado dos microrganismos presentes, com possível produção de enterotoxinas.

Ainda há a possibilidade de os supermercados que comercializam os produtos os armazenarem em temperaturas abusivas, ou ainda que o prazo de validade estabelecido entre 7 e 10 dias seja muito longo para este tipo de alimento. Desse modo é preciso que as indústrias e supermercados revejam suas Boas Práticas de Fabricação e armazenamento para garantir a qualidade e segurança dos vegetais minimamente processados que serão consumidos pela população.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; USALL, J.; ANGUERA, M.; SOLSONA, C.; VIÑAS, I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments, **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 121-129, 2008.

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

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](http://www.aicr.org.uk/Docs/HealthyWise.pdf)2006. Acessado em: 12 de outubro de 2016.

BALAGUÉ, C. et al. Occurrence of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ready-to-eat food from supermarkets in Argentina. **Food microbiology**, v. 23, n. 3, p. 307-313, 2006.

BENNETT, R. W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection**, v.68, p.1264-1270, 2005.

BEUCHAT, L. R.; PETTIGREW, C. A.; TREMBLAY, M. E.; ROSELLE, B. J.; SCOUTEN, A. J. Lethality of chlorine, chlorine dioxide and a commercial fruit and vegetable sanitizer to vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* and spores of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1702-1708, 2004.

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: 12 de outubro de 2016.

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.

CAMPOS, J. et al. Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes, **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 464–470, 2013.

CENCI, S. A. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças: tecnologia, qualidade e sistemas de embalagem**, Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2011. 144 p.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Salmonella enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade, **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v.9, n.16, p. 1947-1972, 2013.

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.

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

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

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.

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

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

HERMAN, K. M.; HALL, A. J.; GOULD, L. H. Outbreaks attributed to fresh leafy vegetables, United States, 1973–2012, **Epidemiology and Infection**, 143:3011–302, 2015.

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

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

LITTLE, C. L.. GILLESPIE, I. A. Prepared salads and public health, **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1729-1743, 2008.

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

LYNCH, M. F.; TAUXE, R. V.; HEDBERG, C. W. The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. **Epidemiology and Infection**, v. 137, p. 307-315, 2009.

MAFFEI et al. Microbiological quality of organic and conventional vegetables sold in Brazil, **Food Control**, v. 29, p. 226-230, 2013.

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

MARQUES, J. M.; FREIRE, D. O.; SILVA, I, C. R.; ORSI, D. C. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças frescas e sanitizadas com hipoclorito de sódio, comercializadas nos supermercados de Brasília. In: 22º Congresso de Iniciação Científica da UnB e 13º Congresso de Iniciação Científica do DF, Anais eletrônicos, 2016.

MORETTI, C. L. **Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**, Brasília: Embrapa Hortaliças, 2007. 531 p.

NASCIMENTO, E. F. et al. Avaliação da temperatura de comercialização de hortaliças minimamente processadas no mercado varejista do Distrito Federal, **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 392, 2003.

NGUZ, K. et al. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. **Food Control**, v. 16, n. 7, p. 623-628, 2005.

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

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

PAULA, N. R. F. et al. Qualidade de produtos minimamente processados e comercializados em gôndolas de supermercados nas cidades de Lavras – MG, Brasília – DF e São Paulo – SP. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 219-227, 2009.

SANT'ANA, A. S. et al. Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life, **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 52–58, 2012.

SANT'ANA, A. S. et al. Prevalence and counts of *Salmonella* spp. in minimally processed vegetables in Sao Paulo, Brazil. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1235-1237, 2011.

SANT'ANA, A. S. et al. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil, **Food Control**, v. 42, p. 1-8, 2014.

SEO, Y-H; JANG, J-H; MOON, K-D. Occurrence and characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from minimally processed vegetables and sprouts in Korea. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 313-319, 2010.

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.

SIVAPALASINGAM, S. et al. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 10, p. 2342-2353, 2004.

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.

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

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

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

ANEXOS