



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

**PAULA ARAÚJO DA COSTA**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA CARNE BOVINA MOÍDA  
COMERCIALIZADA NOS SUPERMERCADOS DE BRASÍLIA, DISTRITO  
FEDERAL**

**BRASÍLIA, DF**

**2017**

PAULA ARAÚJO DA COSTA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA CARNE BOVINA MOÍDA  
COMERCIALIZADA NOS SUPERMERCADOS DE BRASÍLIA, DISTRITO  
FEDERAL**

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

2017

PAULA ARAÚJO DA COSTA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DA CARNE BOVINA MOÍDA  
COMERCIALIZADA NOS SUPERMERCADOS DE BRASÍLIA, DISTRITO  
FEDERAL**

**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

2017

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois sem ele, essa jornada de onze semestres não teria sido vencida, agradeço ao senhor por sempre me dá forças, garra e determinação diante de todos os obstáculos que surgiram durante todo esse tempo, por não me permitir esmorecer quando tudo parecia perdido, tive tantos problemas pessoais ao longo de todo meu curso, mas a tua força em não me deixar perder a fé, me fez vencer tudo, obstáculos ficaram pequenos para o tamanho da minha fé em ti acreditando que abaixo do seu poder, tudo daria muito certo. Quando tenho algum sonho em minha vida sou sempre guiada por ele. Esse com certeza foi mais um sonho realizado perante a ele e com a ajuda dele, com toda certeza se cheguei até aqui, foi por que ele me permitiu, sem a minha fé inabalável no todo poderoso, com certeza não haveria chegado ao término deste curso.

Em segundo lugar de maneira alguma posso esquecer e deixar de agradecer a melhor família que um ser humano poderia ter, a família maravilhosa que tenho, aquela que é a minha base, meu apoio, aquelas pessoas fundamentais para meu sucesso, que nunca desistiram de mim, que acreditaram em mim mesmo quando eu mesmo achava que não daria conta, todas as vezes em que pensei em fraquejar, elas me rodeavam de todo amor e carinho que fosse possível, me dizendo o tempo todo que tudo daria certo, e deu mesmo, são os amores que me apoiam, que tem um amor incondicional e torcem sempre pelo meu sucesso, são aquelas que cruzam os dedos pra que eu realize todos os meus objetivos de vida, sem vocês família, não seria nada, não seria ninguém. Gostaria de agradecer em especial a mulher que me deu a vida, a mais guerreira que já conheci e que tenho como exemplo na minha vida, minha amada mãe que sempre fez de tudo para que nunca nos faltasse nada, que sempre batalhou para criar suas cinco filhas sozinha, mulher guerreira, seu exemplo de força, determinação e disciplina me comovem, me fazem perceber o quanto sou especial por ter sido agraciada de ter nascido de você, meu amor. Dedico à senhora essa vitória, pois a senhora sabe de todas as dificuldades e todos os problemas que tive que enfrentar durante minha vida acadêmica, não foi fácil chegar até aqui, mas cheguei e agradeço demais pelo seu apoio, carinho, amor e dedicação comigo, mesmo que de longe, com certeza, essa vitória também é sua.

Não mais importante gostaria de agradecer com todo meu carinho, a dedicação e acolhimento da professora Dra Daniela Castilho Orsi, que foi como uma mãe para mim desde o início, desde quando pedi que fosse minha orientadora, ela foi super acolhedora, me ensinou, me explicou, me auxiliou o tempo todo, uma mãezona, sempre mostrando a melhor forma de trabalhar, ela que se dedicou junto comigo ao meu trabalho de conclusão de curso, ela me aconselhou, me ajudou e me instruiu todas as vezes que estava insegura e quando as minhas dúvidas surgiam. Ela me mostrava de forma fácil e simplificada o quanto poderia executar melhor as minhas tarefas no laboratório, ela acompanhou de perto todo o meu desenvolvimento e evolução ao longo do meu trabalho final. Tenha consciência de que nunca esquecerei o que fez por mim.

Por fim gostaria de dedicar essa monografia e agradecer também a minha co-orientadora professora Dra Izabel Cristina Rodrigues da Silva que também me acolheu como mãe, que sempre estava disposta a ajudar quando precisávamos dela, que estava sempre pronta a me acalmar e tirar minhas dúvidas quando elas surgiam, graças a ela podemos finalizar e concluir os resultados do nosso trabalho, digo nosso porque sem vocês nada disso teria saído da prática e ido pro papel. Aqui fica meu agradecimento a essas professoras magníficas, obrigada pela confiança.

## RESUMO

Este estudo objetivou avaliar a qualidade microbiológica da carne bovina moída, considerando a importância da comercialização desse produto e a sua susceptibilidade a contaminação microbiológica. Foram realizadas análises microbiológicas em oito amostras de carne bovina moída, adquiridas nos supermercados de Brasília, Distrito Federal. As análises realizadas foram: contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas, determinação de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Salmonella* spp. e identificação molecular de *S. aureus* e de *Salmonella* spp. por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados mostraram que três amostras (amostras 5, 7 e 8) apresentaram-se impróprias para o consumo devido à presença da bactéria *Salmonella* spp (confirmadas geneticamente). Das oito amostras de carne moída analisadas, cinco amostras apresentaram contagens de psicotróficos elevadas (valores acima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g), evidenciando condições higiênicas deficientes no processamento ou condição de refrigeração inadequada. A maioria das amostras (com exceção da amostra 8) apresentaram cepas de *S. aureus*, sendo que 4 amostras (amostras 2, 3, 4 e 7) apresentaram contagem de *S. aureus* acima de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g. A presença de *S. aureus* na carne moída indica condições higiênicas inapropriadas, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada. A presença de bactérias *Salmonella* e contagens elevadas de *S. aureus* em algumas das amostras analisadas são indicadores de pouca higiene de processamento, manipulação e armazenamento da carne moída, que dessa forma, pode representar risco à saúde dos consumidores.

**Palavras chave:** Carne bovina moída. Controle microbiológico. Análises moleculares.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the microbiological quality of ground beef, considering the importance of commercialization of this product and its susceptibility to microbiological contamination. Microbiological analyses were performed on 8 samples of ground beef commercialized in supermarkets of Brasilia, Distrito Federal. The analyses carried out were: total count of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total coliforms and thermotolerant coliforms, enumeration of *Staphylococcus aureus*, detection of *Salmonella* sp. and molecular identification of *S. aureus* and *Salmonella* sp. by the technique of polymerase chain reaction (PCR). The results showed that three samples (samples 5, 7 and 8) were unfit for consumption due to the presence of the bacterium *Salmonella* spp. (genetically confirmed). Of the eight ground beef samples analyzed, five samples showed high psychrotrophic counts (values above  $1.0 \times 10^7$  CFU / g), evidencing hygienic conditions deficient in processing or inadequate refrigeration conditions. Most of the samples (except for sample 8) had *S. aureus* strains and four samples (samples 2, 3, 4 and 7) had a *S. aureus* count above  $1.0 \times 10^3$  CFU / g. The presence of *S. aureus* in ground beef indicates inappropriate hygienic conditions, because it is a bacterium derived from inadequate human manipulation. The presence of *Salmonella* and high counts of *S. aureus* in some of the samples analyzed are indicators of poor hygiene processing, handling and storage of ground beef, which in this way, may be a hazard to human health.

**Key words:** Ground beef. Microbiological control. Molecular analyzes.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. OBJETIVOS .....	18
3. JUSTIFICATIVA .....	19
4. METODOLOGIA .....	20
4.1. Coleta e preparo das amostras para as análises microbiológicas.....	20
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.....	21
4.4. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	23
4.5. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
4.6. Análises moleculares e extração de DNA bacteriano .....	24
4.7. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR .....	26
4.8. PCR qualitativo .....	27
4.9. Eletroforese em gel de agarose.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas .....	29
5.2. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	30
5.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	32
5.4. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	33
6. CONCLUSÕES .....	36
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	22
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.....	26
<b>Tabela 3.</b> Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	27
<b>Tabela 4.</b> Contagem total de bactérias mesófilas e psicrófilas nas amostras de carne bovina moída.....	29
<b>Tabela 5.</b> Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de carne bovina moída.....	31
<b>Tabela 6.</b> Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i> nas amostras de carne bovina moída.....	32
<b>Tabela 7.</b> Contagem de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> nas amostras de carne bovina moída.....	34
<b>Tabela 8.</b> Identificação por meio de PCR de algumas bactérias isoladas das amostras de carne bovina moída.....	35



**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI.....	24
--	----

**LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1</b> .....	43
----------------------	----

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Produção e consumo de carne bovina no Brasil

O Brasil ocupa, atualmente, a posição de segundo maior produtor e de maior exportador mundial de carne bovina. O Brasil é responsável por 17% da produção total mundial da carne bovina e os EUA são responsáveis por 19% (ABIEC, 2016). O país possui um rebanho de 214 milhões de cabeças de gado distribuídos em 167 milhões de hectares de terra, o maior rebanho comercial bovino do mundo (MAPA, 2016; BEEFPOINT, 2016).

A produção de carne bovina em 2015 foi de 9,2 milhões de toneladas equivalente-carcaça de um total de 39,2 milhões de cabeças abatidas. A exportação foi de 1,9 milhões de toneladas equivalente-carcaça, representando 19,6% da produção. Já o mercado interno foi responsável por consumir 81% da carne produzida no Brasil em 2015, sendo o consumo *per capita* interno de 38,6 kg/pessoa/ano (ABIEC, 2016; BEEFPOINT, 2016; MAPA, 2016).

Dessa forma, a carne bovina é um alimento de amplo consumo em todo o país e está presente na dieta da grande maioria da população brasileira (FERREIRA & SIMM, 2012). A carne é uma importante fonte de proteínas de alto valor biológico, vitaminas do complexo B e, especialmente as carnes vermelhas, de ferro de ampla biodisponibilidade em comparação ao ferro presente em alimentos vegetais (SANTOS et al., 2013).

Em nosso país, a carne bovina trata-se de um produto altamente versátil, podendo ser encontrada em diferentes cortes e apresentações, incluindo o seu emprego em inúmeros derivados cárneos. Na forma de carne moída, torna-se popular, sendo acessível à faixa da população com menor poder aquisitivo (MARCHI et al., 2012). Podendo ser utilizada de maneira prática e variada, a carne moída bovina constitui-se uma importante forma de comercialização de carne no varejo, destacando-se como uma excelente fonte de proteínas de boa qualidade (SILVA et al., 2016).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (BRASIL, 2003) a carne moída “é o produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguida de imediato resfriamento ou congelamento”. Trata-se de um produto cru, obtido a partir da moagem de massas

musculares esqueléticas, sendo proibido o uso de tecidos inferiores como ossos, cartilagens, gordura parcial, aponeuroses, tendões, coágulos e nódulos linfáticos. Também não é permitido utilizar na sua elaboração matéria prima oriunda de raspa de ossos e carne mecanicamente separada (BRASIL, 2003).

## 1.2. Qualidade na produção da carne bovina

A qualidade final da carne bovina resulta do que aconteceu com o animal durante toda a cadeia produtiva. Devem-se assegurar procedimentos adequados de abate, manipulação, transporte e armazenamento (ALVES et al., 2005). Após o abate, a maturação da carne bovina é uma técnica normalmente usada para melhorar as características organolépticas da carne (maciez, sabor e suculência), influenciando diretamente na sua qualidade. A maturação consiste na estocagem de cortes cárneos por um período de 15 a 21 dias em câmaras com temperaturas de 0-1°C (ANDRIGHETTO et al., 2006; MORAES & SANTOS, 2008).

Após o abate, a conversão do músculo em carne ocorre a partir das fases de *pré-rigor mortis*, *rigor mortis* e *pós-rigor mortis*. Portanto, as práticas pós-abate dos animais se concretizam com uma sequência de processos enzimáticos no músculo *post-mortem*, que levam a formação de ácido láctico e queda de pH da carne (de 7,0 para 5,5). Nesse momento, o fenômeno do *rigor mortis*, também chamado de rigidez cadavérica é iniciado, sendo considerado como uma contração muscular irreversível caracterizada pela inextensibilidade e rigidez do músculo (ALVES et al., 2005; ANDRIGHETTO et al., 2006).

O *rigor mortis*, que provoca o enrijecimento da carne, faz parte do processo da conversão de músculo em carne após o abate dos animais. No animal abatido (morto) cessa o transporte de oxigênio e de nutrientes do metabolismo celular para os tecidos do corpo. Entretanto os sistemas enzimáticos ainda continuam ativos por algum tempo. Assim a glicólise (quebra da glicose em piruvato) continua, porém no lugar da transformação aeróbica em energia, o músculo agora trabalha em condições anaeróbicas e transforma o piruvato em ácido láctico (ALVES et al., 2005).

O acúmulo de ácido láctico no músculo provoca uma diminuição do pH (de 7,0 para 5,5) e os músculos iniciam o processo de *rigor mortis*, onde gradativamente são formadas pontes cruzadas permanentes entre os filamentos de actina e miosina

(formando o complexo actina-miosina), com contração da musculatura e um enrijecimento da carne, o que corresponde ao *rigor mortis*. O esgotamento do ATP e o abaixamento do pH impedem que o complexo actina-miosina se desfça e que o músculo relaxe (ALVES et al., 2005).

Na etapa de maturação, as enzimas proteolíticas da carne denominadas catepsinas e calpaínas realizam a proteólise dos componentes estruturais das miofibrilas, promovendo o amaciamento “post-mortem”. A maciez da carne será então definida pelo balanço entre o endurecimento induzido pelo *rigor mortis* e o amaciamento durante a maturação (ALVES et al., 2005; ANDRIGHETTO et al., 2006).

Em músculos de bovinos bem alimentados e sem estresse, o valor de pH in vivo típico de 7,2 cai para 5,5 pós morte. Quando os bovinos são acometidos de estresse pré-abate, a reserva de glicogênio dos músculos desses animais pode ser parcial ou totalmente exaurida. Como consequência, o estabelecimento do *rigor mortis* se dá na primeira hora pós abate, mesmo antes de a carcaça ser levada à câmara fria, porque a reserva energética não é suficiente para sustentar o metabolismo anaeróbio e produzir o ácido láctico que abaixa o pH da carne para 5,5 (ALVES et al., 2005).

A carne resultante desse processo terá  $\text{pH} > 5,8$ , o que proporciona às proteínas musculares uma alta capacidade de retenção de água e cor escura. Essa carne terá uma vida de prateleira mais curta, pois na ausência de ácido láctico, as bactérias deteriorantes crescem em pH neutro e utilizam os aminoácidos da carne, causando sua deterioração precoce e a produção de odores desagradáveis (ALVES et al., 2005).

Outro fator importante para a manutenção da qualidade da carne bovina é a refrigeração. A carne necessita de refrigeração imediatamente após o abate, prolongando a vida útil do produto. A obrigatoriedade da refrigeração continua no transporte, manipulação e exposição de cortes para a venda e no armazenamento destes cortes pelo consumidor (ANDRIGHETTO et al., 2006). O transporte da carne bovina até o mercado varejista deve ser realizado em caminhões com sistema de refrigeração, evitando que a temperatura ultrapasse os 7°C, mantendo-se numa faixa de 2 a 4°C (LUNDGREN et al., 2009).

### 1.3. Qualidade e contaminação microbiológica da carne bovina moída

Devido à sua variada composição nutricional, elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade, a carne bovina é um excelente meio para o crescimento de microrganismos que em altas quantidades podem causar deterioração e risco à saúde do consumidor (FERREIRA & SIMM, 2012).

O músculo do animal vivo é estéril, porém, a partir do abate e do processamento, inicia-se a sua contaminação por microrganismos procedentes da pele, do trato intestinal, do meio ambiente, dos manipuladores e equipamentos e utensílios durante o processamento. No geral, a carne apresenta uma microbiota contaminante inicial de  $10^2$  a  $10^4$  UFC/g (ICMSF, 2005).

Entre os microrganismos deteriorantes de produtos cárneos destacam-se os Gram-negativos como *Pseudomonas*, que crescem na superfície do alimento e os Gram-positivos como as bactérias lácticas, que predominam no seu interior. Faz parte também da microbiota deteriorante *Shewanella*, família Enterobacteriaceae, clostrídios psicrotróficos, leveduras e fungos filamentosos (ICMSF, 2005).

As carnes moídas originárias de vários cortes e manipuladas excessivamente podem conter altos níveis de contaminação microbiana. A carne moída tem uma grande superfície de contato, o que contribui para o aumento da flora microbiana. Essa maior superfície favorece o crescimento de bactérias aeróbias, que frequentemente causam a deterioração das carnes (JAMES, 2005).

No caso da carne moída, a moagem é o fator adicional que pode favorecer a contaminação e a multiplicação de microrganismos. Os fatores que mais colaboram com o aumento da contaminação da carne moída são o uso de equipamentos mal higienizados, bancadas sujas, presença de bactérias no moedor pela falta de limpeza ou os próprios manipuladores que, pela falta de informação ou negligência, acabam por transmitir bactérias à carne moída (DIAS et al., 2008).

Os manipuladores representam um possível veículo de contaminação da carne. Este fato exige grande atenção e dedicação a esses profissionais, para que os hábitos de higiene sejam obedecidos, uma vez que a higiene é fundamental para garantir a boa qualidade dos produtos. A utilização de equipamentos de proteção individual por parte dos trabalhadores que manipulam produtos de origem animal deve ter um caráter contínuo, enfatizando a necessidade da higiene e saúde dos manipuladores de alimentos. Esta educação deve salientar a importância da boa

qualidade das matérias primas, a higiene das instalações, utensílios, moedores e dos métodos de preparo da carne moída (ABRAHÃO, NOGUEIRA & MALLUCELI, 2005).

A higienização dos equipamentos e utensílios deve ser realizada de forma rigorosa para que estes não se transformem em potenciais riscos de transmissão de microrganismos devido ao acúmulo de matéria orgânica que acaba levando à formação de biofilme. Em alguns estabelecimentos comerciais, o moedor de carne, as facas destinadas ao corte e os utensílios do estoque raramente são limpos com o cuidado e a frequência necessários para prevenir o aumento do número de microrganismos (JAMES, 2005).

#### **1.4. Microrganismos patogênicos na carne moída**

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são causadas por agentes biológicos (bactérias, fungos, vírus, parasitas e toxinas produzidas por estes), os quais penetram no organismo humano através da ingestão de água ou alimentos contaminados. Os alimentos contaminados podem se apresentar aparentemente inofensivos, apresentando odor e sabor normais, dificultando por parte do consumidor identificar qual alimento poderia estar contaminado (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A maioria dos surtos de DTA é decorrente do consumo de alimentos crus e produtos cárneos. A carne moída, em particular, apresenta altos níveis de contaminação microbiana em relação aos outros cortes, por sofrer maior manipulação e possuir maior relação área/volume. Por ser muito usada em diversas preparações culinárias como recheios de sanduíches, de tortas, de salgadinhos e como complemento de diversos pratos, a carne moída está mais susceptível a carrear microrganismos deteriorantes e patogênicos para os alimentos manipulados com falhas de processamento (SOUSA et al, 2012).

Bactérias patogênicas capazes de causar doenças transmitidas por alimentos e que podem constituir um risco de contaminação na carne bovina são: *Salmonella* spp., *Escherichia coli* (com destaque para o sorogrupo O157), *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e alguns sorotipos de *Yersinia enterocolitica* (ICMSF, 2005).

Os parâmetros microbiológicos adotados pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) determinam para a carne bovina moída a ausência de *Salmonella* em 25 g de amostra. A legislação da União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2005) determina para a carne bovina moída a contagem máxima de  $5,0 \times 10^6$  UFC/g para bactérias aeróbias totais, contagem máxima de  $5,0 \times 10^2$  UFC/g para *E. coli* e ausência de *Salmonella*. A legislação da Nova Zelândia (NOVA ZELÂNDIA, 1995) determina para a carne moída a contagem máxima de  $5,0 \times 10^6$  UFC/g para bactérias mesófilas totais, contagem máxima de  $1,0 \times 10^3$  NMP/g para coliformes termotolerantes, contagem máxima de  $1,0 \times 10^3$  NMP/g para *Staphylococcus aureus* e ausência de *Salmonella*.

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos gram-negativos e bioquimicamente são em geral lactose e sacarose negativas, mas fermentam a glicose com produção de gás. Seu habitat é no trato intestinal de animais e seres humanos. Sua principal via de transmissão é pelos alimentos que podem ser contaminados direta ou indiretamente pelas fezes dos animais portadores da bactéria, pelos utensílios utilizados no preparo do alimento, equipamentos e/ou pelo contato com águas poluídas (CARVALHO, 2006).

O grupo de coliformes compreende os coliformes totais e termotolerantes, sendo que o grupo de coliformes totais é representado por todos os bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos que não formam esporos e que são capazes de fermentar lactose com produção de gás, quando incubados na temperatura de 35-37°C por 24-48 horas. Já os coliformes termotolerantes, também conhecidos como coliformes fecais, compreendem o grupo de bactérias que vivem no trato gastrointestinal de humanos e de animais de sangue quente. Os gêneros encontrados nesse grupo são *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, sendo que *E. coli* representa 90% dos coliformes termotolerantes e é considerado um indicador de contaminação de origem fecal. Algumas cepas patogênicas de *E. coli*, ao serem ingeridas, multiplicam-se no intestino e produzem toxinas, sendo uma causa comum de DTA (FRANCO & LANDGRAF, 2008, GUZMÁN et al., 2004).

O *Staphylococcus aureus* produz muitos fatores de virulência, como as enterotoxinas, que possuem termoestabilidade a 100°C por 30 minutos e resistência a ação das enzimas gástricas. A intoxicação alimentar por estafilococos é causada pela ingestão da toxina bacteriana presente no alimento, geralmente resultante de sua contaminação por um portador humano, uma vez que aproximadamente metade

das infecções se origina de portadores com contaminação assintomática na nasofaringe (através de um espirro ou mãos contaminadas). Após a ingestão do alimento contaminado, o surgimento da doença é rápido com presença de vômitos severos, diarreia e dores abdominais (BENNETT, 2005; SANTANA et al., 2010). 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.

### 1.5. Atualizações na legislação sobre a carne

Em 29 de março de 2017 foi publicado o novo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (BRASIL, 2017). O antigo regulamento data de 29 de março de 1952 e estava há 65 anos sem atualização. A revisão do RIISPOA contemplou a implantação de novas tecnologias, padronização de procedimentos técnicos e administrativos, maior harmonização com a legislação internacional, interação com outros órgãos públicos de fiscalização, ordenação didática das normas para facilitar a consulta e atualização de terminologias ortográfica e técnica. Doenças que afetavam os animais, como zoonoses, no antigo RIISPOA, não estão mais presentes. Esse tipo de preocupação foi substituída por cuidados com patógenos, como a *Salmonella*, que é um problema atual (MAPA, 2017).

O novo regulamento estabelece a obrigatoriedade da renovação da rotulagem dos produtos de origem animal a cada 10 anos. Entre as mudanças introduzidas na legislação está a elevação de penalidades. Por meio de medida provisória, a multa máxima a ser aplicada, no caso de irregularidades, passa de R\$ 15 mil para R\$ 500 mil. Outra medida de penalidade é a perda do selo SIF (Serviço de Inspeção Federal) pela empresa que cometer três irregularidades gravíssimas em um ano. O novo regulamento também deixa bem claro a responsabilidade das empresas e do Estado na fiscalização sanitária dos produtos de origem animal (MAPA, 2017).

Já o governo do Estado de Santa Catarina regulamentou em 2015 a venda de carnes em açougues e supermercados. Em dois decretos publicados foi efetuada a classificação dos açougues em dois tipos: A e B. O tipo A é o açougue que pode atuar no fracionamento e tempero da carne in natura, com embalagem. Esse açougue por meio de certificação deve ter local específico para fracionar, embalar e



rotular carnes para comercializar no local, com ambiente e equipamentos de frigorífico, atendendo a legislação específica de rótulos e com responsável técnico. O açougue tipo A pode comercializar a carne moída embalada com prazo de validade determinado pelo responsável técnico. Também pode dispor as carnes para comercialização em balcões de autoatendimento, sendo estas manipuladas no próprio estabelecimento. E pode vender a carne temperada no estabelecimento, embalada e com rotulagem específica. Já o tipo B é o açougue que por falta de ambiente e equipamentos de frigorífico, fica proibido de vender a carne fracionada e/ou temperada e reembalada (não poderão moer a carne antecipadamente). Eles deverão fazer o corte e moagem da carne na presença do cliente, além de não poder mais vender carne temperada. Considera-se que o açougue tipo B não tem ambiente ou equipamentos para manter a segurança microbiológica da carne fracionada e/ou temperada (CIDASC, 2015).

#### **1.6. Uso da PCR na identificação de espécies de bactérias patogênicas**

A fundamentação das técnicas microbiológicas para alimentos baseiam-se em testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros e espécies microbianas. As técnicas microbiológicas mais comuns de diferenciação utilizam meios de cultivo seletivos complementados com testes bioquímicos e sorológicos (GANDRA et al., 2008).

Testes bioquímicos podem apresentar uma grande variabilidade de resultados, visto que fatores ambientais influenciam a expressão genética dos microrganismos, aumentando o risco de interpretações errôneas. O aumento na quantidade de testes bioquímicos diminui sua variabilidade e possíveis erros, porém, eleva o custo financeiro (FARBER et al., 2001).

As técnicas tradicionais de detecção de microrganismos apesar de eficientes e confiáveis, requerem bastante tempo para a obtenção dos resultados. Além disso, a variabilidade fenotípica por onde as bactérias são identificadas e diferenciadas, pode não ser expressa, dificultando ou impossibilitando a identificação e também ocorre a chance de obter células viáveis, porém não cultiváveis (MARIN et al., 2006).

Pode-se notar um aumento significativo no desenvolvimento de técnicas moleculares para identificação de microrganismos nas últimas décadas, devido ao

avanço nos estudos na área de biologia molecular. Essas técnicas se baseiam na caracterização de DNA cromossomal, plasmidial ou total de microrganismos (GANDRA et al., 2008).

Entre as técnicas de identificação molecular, destaca-se a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullins em 1985. Essa técnica de identificação, altamente sensível, baseia-se em duplicações de pequenas quantidades de sequência de DNA específico presente em um conjunto complexo. As sequências de DNA são enzimaticamente amplificadas até obtenção de milhões de cópias do seguimento específico por meio da enzima Taq DNA polimerase e de *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) sobre um DNA molde. A técnica de PCR é realizada em equipamentos automatizados e computadorizados chamados termocicladores, que promovem a alternância de temperatura em tempos definidos, possibilitando a ocorrência de ciclos de desnaturação e síntese de DNA (GANDRA et al., 2008).

A introdução da PCR na identificação microbiológica em alimentos trouxe diversas vantagens em relação aos métodos tradicionais, tais como, maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade e especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (GANDRA et al., 2008).

A técnica da PCR 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: a complexidade do método para as análises de rotina, a incapacidade de diferenciar células vivas de células mortas, a presença de inibidores da taq polimerase em alguns alimentos, o alto investimento em equipamentos e reagentes e ainda a falta de aprovação e regulamentação desse método por parte dos órgãos competentes (GANDRA et al., 2008; MARLONY et al., 2003).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica da carne moída bovina comercializada nos supermercados de Brasília, Distrito Federal.

### 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 aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

### **3. JUSTIFICATIVA**

A carne, por suas características intrínsecas, constitui excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos, podendo ser responsável pela transmissão de bactérias patogênicas para o homem. A alta contagem microbiana na carne pode ser proveniente do abate dos animais doentes ou portadores de bactérias patogênicas, mas, também pela manipulação em condições precárias de higiene, condições inadequadas de temperatura no armazenamento e higiene inadequada dos manipuladores. A carne moída bovina é um dos produtos cárneos mais comercializados devido à diversidade de uso, ao menor custo comparado a outros cortes bovinos e a facilidade e preparo. A preocupação com este alimento torna-se ainda maior quando a carne é previamente fracionada, por diferentes utensílios como facas e moedores e manipulada em condições de higiene e ambiente adversas. Portanto, o presente trabalho visou avaliar a qualidade microbiológica de um produto alvo de contaminação microbiana, contribuindo com informações acerca da qualidade da carne moída adquirida em supermercados no Distrito Federal.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Coleta e preparo das amostras para as análises microbiológicas**

Foram coletadas oito amostras de carne bovina moída, comercializadas em seis diferentes supermercados Brasília no período de Outubro de 2016 a Março de 2017. Todas as amostras se encontravam em bandejas de isopor e expostas ao consumo nos balcões refrigerados, dentro do prazo de validade e foram mantidas sob refrigeração até o início das análises. Os cortes bovinos das carnes moídas eram: acém, patinho e paleta.

As coletas das amostras foram realizadas no mesmo dia em que se iniciaram as análises laboratoriais, sendo as mesmas transportadas por tempo máximo de uma hora até o laboratório. Para o preparo das amostras, foram pesadas, assepticamente, 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, 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 mesófilas e psicrotróficas**

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

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

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

<b>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%.</b>											
<b>Tubos positivos</b>			<b>NMP/g</b>	<b>Limite de confiança</b>		<b>Tubos positivos</b>			<b>NMP/g</b>	<b>Limite de confiança</b>	
<b>0.10</b>	<b>0.01</b>	<b>0.001</b>		<b>Baixo</b>	<b>Alto</b>	<b>0.10</b>	<b>0.01</b>	<b>0.001</b>		<b>Baixo</b>	<b>Alto</b>
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>

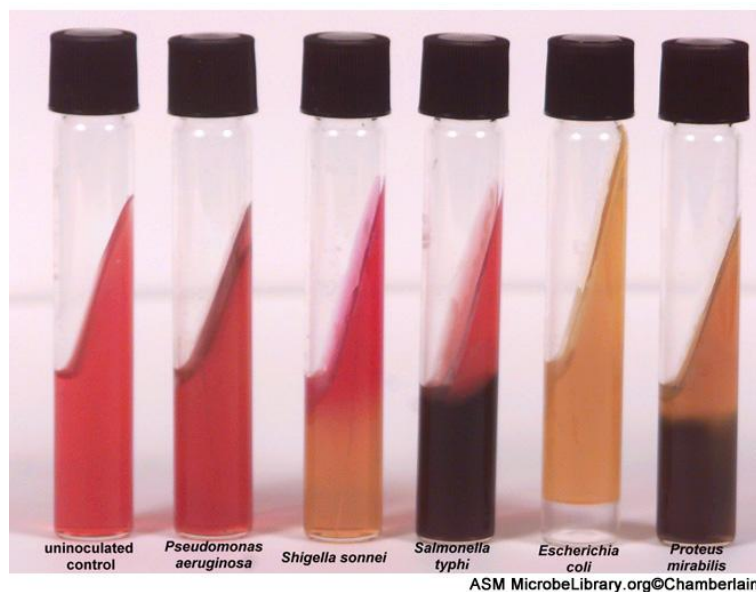
#### 4.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., 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 Agar *Salmonella Shigella* (Agar SS).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em Agar *Salmonella Shigella* para obtenção de colônias puras e então estas foram transferidas para meio de cultivo contendo Agar 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 micro-organismo 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 Agar 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). As colônias suspeitas foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.





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

#### 4.5. Contagem de *Staphylococcus aureus*

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

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

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das soluções reagentes (o tampão AW foi colocado em banho-maria à 50°C), materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas das amostras de *sashimis* 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, Alemanha), com adaptações, descritas a seguir:

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

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

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

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

#### 4.7. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

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

- entC: anotação descrita para o gene que codifica enterotoxina C do *S. aureus*
- invA: anotação descrita para o gene que codifica as proteínas de invasão celular de *Salmonella* spp.

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 [Símbolo]G de formação de híbridos. Os primers específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 3.

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

Oligonucleotídeo	Sequência (5´ 3´)	Produto estimado	Espécie
entC_F	TTTTACACCCAACGTATTAGCAGA	401 pb	<i>S. aureus</i>
entC_R	TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
invA_F	GCTGATGCCGGTGAAATTAT	445 pb	<i>Salmonella</i> spp.
invA_R	CGACAAGACCATCACCAATG		

#### 4.8. PCR qualitativo

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

Foram utilizados, para cada reação de PCR: 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5 µL de oligonunleotídeos foward 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<sup>®</sup>).

#### 4.9. Eletroforese em gel de agarose

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

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

A tabela 4 apresenta os resultados da contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de carne moída, expressos como média de UFC/g e log de UFC/g com o desvio padrão. A legislação brasileira não estabelece limites para contagem total de microrganismos nos alimentos. Porém, tanto a legislação da União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2005) quanto à legislação da Nova Zelândia (NOVA ZELÂNDIA, 1995) determinam para a carne moída a contagem máxima de  $5,0 \times 10^6$  UFC/g para bactérias mesófilas totais. Já a Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002), permite uma contagem máxima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g de microrganismos totais para os alimentos em geral.

**Tabela 4. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de carne bovina moída**

Amostras de carne moída	Bactérias Mesófilas		Bactérias Psicrotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g $\pm$ DP	UFC/g	Log UFC/g $\pm$ DP
Amostra 1	$1,1 \times 10^6$	$5,9 \pm 0,33$	$5,1 \times 10^7$	$7,3 \pm 0,88$
Amostra 2	$1,2 \times 10^6$	$6,1 \pm 0,08$	$1,1 \times 10^8$	$7,5 \pm 0,12$
Amostra 3	$5,1 \times 10^3$	$4,5 \pm 0,40$	$8,6 \times 10^6$	$6,9 \pm 0,18$
Amostra 4	$2,1 \times 10^4$	$4,2 \pm 0,23$	$9,1 \times 10^6$	$6,9 \pm 0,09$
Amostra 5	$2,5 \times 10^6$	$6,3 \pm 0,15$	$7,8 \times 10^6$	$6,87 \pm 0,17$
Amostra 6	$6,3 \times 10^5$	$5,63 \pm 0,54$	$2,9 \times 10^7$	$7,14 \pm 0,80$
Amostra 7	$1,3 \times 10^6$	$6,05 \pm 0,34$	$2,5 \times 10^7$	$7,3 \pm 0,43$
Amostra 8	$2,3 \times 10^6$	$6,2 \pm 0,50$	$2,1 \times 10^7$	$7,2 \pm 0,15$

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

Neste estudo, as amostras de carne moída mostraram contagens de bactérias mesófilas entre  $2,1 \times 10^4$  e  $2,5 \times 10^6$  UFC/g e contagens de bactérias psicrotróficas entre  $7,8 \times 10^6$  e  $5,1 \times 10^7$  UFC/g. Todas as amostras de carne moída

mostraram contagens aceitáveis de bactérias mesófilas totais, não excedendo o valor limite de  $5,0 \times 10^6$  UFC/g, estabelecido pelas legislações da União Europeia e da Nova Zelândia.

Porém, todas as amostras de carne moída mostraram contagens de bactérias psicotróficas maior que a contagem de bactérias mesófilas. Os microrganismos psicotróficos em número elevado são responsáveis pela diminuição da vida de prateleira dos alimentos refrigerados, constituindo os seus principais deterioradores (APHA, 2001). Das oito amostras de carne moída analisadas, cinco amostras apresentaram contagens de psicotróficos elevadas (valores acima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g), evidenciando condições higiênicas deficientes no processamento ou condição de refrigeração inadequada.

Resultados parecidos foram obtidos por Marchi et al. (2012) que analisaram amostras de carne bovina moída adquiridas em diferentes supermercados e açougues de Jaboticabal, SP e verificaram que das 30 amostras analisadas, mais da metade das amostras (17 amostras, 56,6%) apresentaram altas contagens de microrganismos psicotróficos (acima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g). Já no estudo de Oliveira et al. (2008), das 5 amostras de carne moída analisadas provenientes de 5 estabelecimentos comerciais de Lavras, MG, 2 amostras apresentaram altas contagens de microrganismos psicotróficos (acima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g).

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

Os resultados obtidos nas análises de determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de carne moída estão demonstrados na tabela 5. A legislação brasileira não estabelece limites para contagem de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de carne bovina moída. No entanto, a legislação da Nova Zelândia (NOVA ZELÂNDIA, 1995) determina para a carne moída contagem máxima de  $1,0 \times 10^3$  NMP/g para coliformes termotolerantes e a legislação da União Europeia (UNIÃO EUROPEIA, 2005) determina contagem máxima de  $5,0 \times 10^2$  UFC/g para *E. coli*.

**Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de carne bovina moída**

Amostras de carne moída	Coliformes Totais		Coliformes Termotolerantes	
	NMP/g	Log UFC/g ± DP	UFC/g	Log NMP/g ± DP
Amostra 1	8,8x10 <sup>2</sup>	2,9 ± 0,22	4,7x10 <sup>2</sup>	2,4 ± 0,54
Amostra 2	3,2x10 <sup>1</sup>	1,2 ± 0,04	1,5x10 <sup>1</sup>	1,1 ± 0,25
Amostra 3	8,1x10 <sup>1</sup>	1,9 ± 0,33	1,3x10 <sup>1</sup>	1,1 ± 0,06
Amostra 4	1,7x10 <sup>2</sup>	1,8 ± 0,71	3,1x10 <sup>1</sup>	1,4 ± 0,66
Amostra 5	3,4x10 <sup>1</sup>	1,4 ± 0,04	1,2x10 <sup>1</sup>	1,0 ± 0,22
Amostra 6	3,8x10 <sup>1</sup>	1,9 ± 1,05	1,6x10 <sup>1</sup>	1,2 ± 0,50
Amostra 7	6,2x10 <sup>1</sup>	1,8 ± 0,53	1,6x10 <sup>1</sup>	1,2 ± 0,08
Amostra 8	7,5x10 <sup>1</sup>	1,9*	0,4x10 <sup>1</sup>	0,5*

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata, DP = desvio padrão; \* não foi possível calcular o DP da amostra.

Neste estudo, as amostras de carne moída mostraram enumeração de coliformes totais entre 3,2x10<sup>1</sup> e 8,8x10<sup>2</sup> NMP/g e enumeração de coliformes termotolerantes entre 0,4x10<sup>1</sup> e 4,7x10<sup>2</sup> NMP/g. Apenas a amostra 1 mostrou enumeração mais elevada de coliformes totais (8,8x10<sup>2</sup> NMP/g) e de coliformes termotolerantes (4,7x10<sup>2</sup> NMP/g), porém permanecendo dentro dos limites permitidos pela legislação neozelandesa (máximo de 1,0x10<sup>3</sup> NMP/g para coliformes termotolerantes).

Contagens elevadas de coliformes totais indicam falhas higiênicas durante o processamento, sendo importante analisar a presença deste grupo por ser indicador da qualidade higiênico-sanitária dos alimentos (ABREU et al. 2011; LUNDGREN et al., 2009). Os coliformes termotolerantes constituem um grupo de enterobactérias capazes de fermentar a lactose a 45°C com produção de gás e ácido. Tais microrganismos são encontrados no trato intestinal de humanos e outros animais. Altas contagens de coliformes termotolerantes indicam contaminação fecal e possibilidade da presença de microrganismos patogênicos (DIAS et al., 2008; FRANCO; LANDGRAF, 2008).



Outros trabalhos relataram contagens mais elevadas de coliformes termotolerantes em amostras de carne bovina moída. No trabalho de Abreu et al. (2011), de um total de 10 amostras de carne moída bovina analisadas provenientes de supermercados e açougues da cidade de Umuarama, PR, 3 amostras apresentaram contagens de coliformes totais e termotolerantes superiores a  $1,0 \times 10^3$  NMP/g. No estudo de Dias et al. (2008), de um total de 24 amostras de carne moída bovina analisadas provenientes de 10 diferentes estabelecimentos da região sul do Rio Grande do Sul, 2 amostras apresentaram contagens de coliformes termotolerantes acima de  $1,0 \times 10^3$  NMP/g.

### 5.3. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A Tabela 6 apresenta os resultados da pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de carne bovina moída. De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2001), bactérias do gênero *Salmonella* devem estar ausentes na carne bovina. Bactérias desse gênero podem causar toxinfecções alimentares, conferindo risco ao consumidor, tornando o alimento impróprio para o consumo.

**Tabela 6. Pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de carne bovina moída**

<b>Amostras de carne moída</b>	<b>Agar SS *</b>	<b>Agar TSI **</b>	<b>Resultado da PCR <i>Salmonella</i> spp.</b>
Amostra 1	ND	ND	ND
Amostra 2	ND	ND	ND
Amostra 3	ND	ND	ND
Amostra 4	ND	ND	ND
Amostra 5	Suspeito	Suspeito	Confirmado
Amostra 6	ND	ND	ND
Amostra 7	Suspeito	Suspeito	Confirmado
Amostra 8	Suspeito	Suspeito	Confirmado

\* colônias não fermentadoras de lactose/ pigmento preto; \*\* superfície do meio vermelho e base amarela ou com pigmento preto; ND = não detectado.

Neste estudo, foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em três amostras de carne moída (amostras 5, 7 e 8), confirmadas na análise de PCR para a presença do gene *invA* (ANEXO 1, figura A). Portanto essas amostras estavam impróprias para o consumo.

No trabalho de SOUSA et al. (2012), foram analisadas 30 amostras de carne moída comercializadas em 10 açougues e supermercados na cidade de Barra do Garças-MT e detectou-se em cinco amostras (17%) a presença de *Salmonella* sp., mostrando que estes alimentos sofreram contaminação fecal durante o seu processamento e/ou manipulação. Ferreira e Simm (2012) encontraram apenas uma amostra de carne moída com a presença de *Salmonella* spp. de um total de seis amostras analisadas provenientes de um açougue da região central do município de Pará de Minas-MG. No estudo realizado por Dias et al. (2008), de um total de 24 amostras de carne moída coletadas no comércio varejista da região sul do Rio Grande do Sul, apenas em uma amostra detectou-se a presença de *Salmonella*.

#### **5.4. Contagem de *Staphylococcus aureus***

A Tabela 7 apresenta os resultados das contagens de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras deste estudo. A legislação brasileira não estabelece limites para a contagem de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de carne bovina moída. No entanto, a legislação da Nova Zelândia (NOVA ZELÂNDIA, 1995) determina para a carne moída a contagem máxima de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g para *S. aureus*.

Neste trabalho, a maioria das amostras (com exceção da amostra 8) apresentaram cepas de *S. aureus*, sendo que 4 amostras (amostras 2, 3, 4 e 7) apresentaram contagem de *S. aureus* acima de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g. A presença de *Staphylococcus aureus* nos alimentos indica condições higiênicas inapropriadas, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada. Devido ao excesso de manipulação, a carne moída é um produto que se contamina facilmente com *Staphylococcus aureus* (ALMEIDA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008; SANTANA et al., 2010).

**Tabela 7. Contagem de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de carne bovina moída**

Amostras de carne moída	Colônias fermentadoras de manitol, após coloração de Gram ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 1	1,0x10 <sup>2</sup>	2,0 ± 0,00
Amostra 2	1,0x10 <sup>3</sup>	3,0 ± 0,00
Amostra 3	1,7x10 <sup>3</sup>	3,2 ± 0,09
Amostra 4	7,7x10 <sup>3</sup>	3,9 ± 0,09
Amostra 5	5,3 x10 <sup>2</sup>	2,8 ± 0,05
Amostra 6	3,0 x10 <sup>2</sup>	2,4 ± 0,49
Amostra 7	2,0x10 <sup>3</sup>	3,3 ± 0,00
Amostra 8	ND	ND

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata, DP = desvio padrão, ND = não detectado

Quanto à análise molecular, foi observado que das quinze colônias suspeitas de *S. aureus*, isoladas das amostras 1 a 7, quatorze foram confirmadas na análise de PCR para a presença do gene *entC*, ou seja, são potenciais produtoras de enterotoxina C, conforme descrito na tabela 8 e ANEXO 1 (Figura B).

**Tabela 8. Identificação por meio de PCR de bactérias de *Staphylococcus aureus* isoladas das amostras de carne bovina moída comercializadas em Brasília – DF.**

Número da colônia	Amostra	Resultado Molecular
PA1	2	<i>S. aureus</i> +
PA2	2	<i>S. aureus</i> +
PA3	3	<i>S. aureus</i> +
PA4	3	<i>S. aureus</i> +
PA5	4	<i>S. aureus</i> +
PA6	4	<i>S. aureus</i> +
PA7	4	<i>S. aureus</i> +
PA8	7	<i>S. aureus</i> +
PA9	7	<i>S. aureus</i> +
PA10	7	<i>S. aureus</i> +
PA11	5	<i>S. aureus</i> +
PA12	5	<i>S. aureus</i> -
PA13	5	<i>S. aureus</i> +
PA14	6	<i>S. aureus</i> +
PA24	1	<i>S. aureus</i> +
CP	Controle Positivo <i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i> +
BEL11	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
BEL72	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
BEL73	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
BEL74	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
CN	<i>S. aureus</i> -	<i>S. aureus</i> -

Sendo a contaminação por *S. aureus* frequente em produtos manipulados como a carne bovina moída, vários outros estudos relataram a presença dessa bactéria. Nos estudos de ABREU et al. (2011) e de SOUZA et al. (2012) foi verificado que todas as amostras de carne moída analisadas apresentaram cepas de *S. aureus*, porém em níveis inferiores a  $1,0 \times 10^3$  UFC/g. Já no trabalho de OLIVEIRA et al. (2008), todas as 5 amostras de carne moída bovina analisadas apresentaram elevadas contagens de *S. aureus* (entre  $3,3 \times 10^3$  e  $1,1 \times 10^5$  UFC/g). E no estudo de Marchi et al. (2012), de um total de 24 amostras de carne moída analisadas, 7 amostras apresentaram contagens de *S. aureus* acima de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g.

## 6. CONCLUSÕES

Neste estudo três amostras de carne moída das oito amostras analisadas apresentaram-se impróprias para o consumo devido à presença da bactéria *Salmonella* spp. A maioria das amostras apresentaram cepas de *S. aureus*, sendo que metade das amostras apresentou contagem de *S. aureus* acima de  $1,0 \times 10^3$  UFC/g, evidenciando condições higiênicas deficientes no processamento.

A presença de *Salmonella* e contagens elevadas de *Staphylococcus aureus* em algumas das amostras de carne moída bovina analisadas nesse estudo indicaram falta de qualidade dos produtos e até possível risco de causar toxinfecção alimentar. A presença destes microrganismos sugere a necessidade de observar melhor como os processos de boas práticas de fabricação estão sendo realizados nos supermercados de Brasília, a fim de melhorar a qualidade final da carne moída bovina oferecida ao consumidor do Distrito Federal.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC, 2016. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, 2016. Disponível em: <http://sna.agr.br/brasil-sera-o-maior-produtor-mundial-de-carne-bovina-em-5-anos-preve-abiec/>

ABRAHÃO R. C.; NOGUEIRA P. A.; MALLUCELI M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.1-17, 2005.

ABREU, C. O.; MERLINI, L. S.; BEGOTTI, I. L. Pesquisa de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, coliformes totais e coliformes termotolerantes em carne moída comercializada no município de Umuarama - PR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 14, n. 1, p. 19-23, 2011.

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

ALVES, D. D; TONISSI, R. H; GOES, B; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 135-149, 2005.

ANDRIGHETTO, C. et al. Maturação da carne bovina, **Revista Electrónica de Veterinária REDVET**, v. 7, n. 6, p. 1-6, 2006.

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.

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.

BEEFPOINT, 2016. Perfil da Pecuária no Brasil – Relatório Anual 2016, Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/perfil-da-pecuaria-no-brasil-relatorio-anual-2016/>

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.

BRASIL, DECRETO Nº 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017, RIISPOA, Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, 2017, Disponível em: [http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/RIISPOA-Decreto-9013\\_29\\_03\\_2017.pdf](http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/RIISPOA-Decreto-9013_29_03_2017.pdf)

BRASIL. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne bovina em conserva (*corned beef*) e carne moída de bovino, Disponível em: [http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/\\$FILE/IN%20N%C2%BA%2083-2003.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/$FILE/IN%20N%C2%BA%2083-2003.pdf)

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.

CARVALHO, V. M. **Colibacilose e salmonelose**. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. São Paulo: Roca, p. 742-750, 2006.

CIDASC 2015. DISPONÍVEL EM:  
<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/DECRETO-Nº1-DE-8-01-2015.pdf>  
<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/DECRETO-Nº2-DE-1-01-1015.pdf>

DIAS, P. A; CONCEIÇÃO, R. C. S; COELHO, F. J. O; TEJADA, M; TIMM, C. D. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.3, p.359-36, 2008.

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.

FENG, P.; WEAGENT, S. D; GRANT, M. A. **Bacteriological Analytical Manual Online: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria**, 2002. Disponível em:  
<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>

FERREIRA, R; SIMM, E. M. Análise microbiológica da carne moída de um açougue da região central do município de Pará de Minas/MG. **SynThesis Revista Digital FAPAM**, n.3, p. 37 - 61, 2012.

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**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

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.



ICMSF. 2005. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

JAMES, M. J. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto alegre: Editora Artmed, 2005

LUNDGREN, U. P; SILVA, A. J; MACIEL, F. J; FERNANDES, M. T. Perfil da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa, PB. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 113-119, 2009.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Notícias: Novo regulamento da inspeção de produtos de origem animal prevê penas mais severas, 20/03/2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/novo-regulamento-da-inspecao-de-produtos-de-origem-animal-reforca-seguranca-alimentar>.

MAPA, 2016. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/producao-de-carne-no-brasil-aumenta-45-em-15-anos>

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.

MARCHI, G. P; JUNIOR, R. D. O; CERESER, D. N; SOUZA, V; REZENDE, M. C. N; FARIA, A. A. Avaliação microbiológica e físico-química da carne bovina moída comercializada em supermercados e açougues de Jaboticabal – SP. **Revista Eletrônica da Univar**, n. 7, p. 81 – 87, 2012.

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.

MORAES, G. J., SANTOS, T. A. B. Qualidade de carne bovina. **PUBVET**, v. 2, n. 27, 2008.

NOVA ZELÂNDIA, Food Administration, Manual microbiological reference criteria for food, 1995. Disponível em: [http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Microbiological\\_Reference-Guide\\_Assess.pdf](http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Microbiological_Reference-Guide_Assess.pdf)

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; MENDONÇA, A. T.; PICCOLI, R. H. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1893-1898, 2008.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTOS R.D., GAGLIARDI A.C.M., XAVIER H.T., MAGNONI C.D., CASSANI R., LOTTENBERG A.M. ET AL. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, n. 1, supl. 3, p. 1-40, 2013.

SILVA, N. C.; LIMA, W. M.; LEITE, P. R. S. C.; CIESLAK, J. F. Determinação de coliformes em carne moída bovina em açougues da cidade de Ceres, GO. **Revista Higiene Alimentar**, v. 30, n.262, p. 99-103, 2016.

SOUSA, M. T; NETO, C. A; HERNANDES, T; SOUTO, S. C. P. Microrganismos patogênicos e indicadores de condições higiênico-sanitária em carne moída comercializada na cidade de Barra do Garças, MT. **Acta Veterinária Brasília**, v.6, n.2, p.124-130, 2012.

UNIÃO EUROPEIA. Regulamento (CE) no 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Disponible em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=ES>

## ANEXO 1



Figura A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do *invA* de *Salmonella* spp. M = marcador de 100 pb; PA37 a PA39 = amostras deste estudo com amplicons de *invA* (445 pb) CP= controle positivo ATCC 14028; CN = Controle Negativo; MA8 e MA15 = controles internos do laboratório.



Figura B. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *entC* de *S. aureus*. 100pb = marcador de 100 pb; PA1 a PA24 = amostras deste estudo com amplicons de *entC* (401 pb); CP= controle positivo ATCC 33862; BEL11 a BEL74 = controles internos do laboratório; CN= Controle Negativo.