



LARYSSA DE CASTRO MANFRIN

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CARNE MOÍDA BOVINA
COMERCIALIZADA NOS SUPERMERCADOS DAS CIDADES DE BRASÍLIA E
TAGUATINGA – DF.**

BRASÍLIA, DF
2013

LARYSSA DE CASTRO MANFRIN

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CARNE MOÍDA BOVINA
COMERCIALIZADA NOS SUPERMERCADOS DAS CIDADES DE BRASÍLIA E
TAGUATINGA – DF.**

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

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

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

BRASÍLIA, DF

2013

LARYSSA DE CASTRO MANFRIN

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CARNE MOÍDA BOVINA
COMERCIALIZADA NOS SUPERMERCADOS DAS CIDADES DE BRASÍLIA E
TAGUATINGA – DF.**

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Prof. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF
2013

RESUMO

Fatores como o excesso de manipulação e a utilização de equipamentos e utensílios com higienização deficiente, fazem com que a carne moída se contamine facilmente, tornando-se um produto problemático frequentemente envolvido nos surtos de doenças transmitidas por alimentos. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica da carne moída. Foram coletadas 18 amostras de carne moída bovina embaladas em bandejas de isopor expostas ao consumo em 6 diferentes supermercados das cidades de Brasília e Taguatinga, no período de três semanas consecutivas entre os meses de Julho e Agosto de 2013. De acordo com a legislação argentina que padroniza os limites de micro-organismos mesófilos no produto nenhuma amostra se apresentou imprópria para o consumo. Constatou-se que das 18 amostras de carne moída bovina analisadas, somente as amostras correspondentes à terceira semana de coleta de todos os supermercados mostraram contagens altas de bactérias psicotróficas (entre 10^6 e 10^7 UFC/g), 12 amostras (66,67%) apresentaram cepas de *S. aureus* indicando condições higiênicas inapropriadas e/ou o processamento deficiente, 3 delas (16,66%) apresentaram contagens de coliformes totais superiores a 1×10^3 NMP/g e 1 (5,55%) para contagem de coliformes termotolerantes. Apenas 1 amostra (5,55%) foi condenada para consumo devido a presença de *Salmonella spp* em 25g de amostra. Todas as amostras positivas nos testes microbiológicos para *Salmonella* e *S. aureus* foram comprovadas por método molecular através da técnica de PCR.

Palavras chave: carne moída bovina; análises microbiológicas; qualidade; fontes de contaminação

ABSTRACT

Factors such as excessive manipulation and use of equipment and utensils with poor hygiene make minced beef be contaminated easily, making it a problematic product often involved in outbreaks of foodborne illness. This work was designed to assess the microbiological quality of ground beef. We collected 18 samples of ground beef packaged in trays and exposed to consumption in six different supermarkets in the cities of Brasilia and Taguatinga, in three consecutive weeks between July and August 2013. According to an Argentine law, that standardizes the limits of mesophilic microorganisms in the product, no sample was improper for consumption. We found out that from the 18 ground beef samples analyzed, only the samples corresponding to the third week of collecting all supermarkets showed high levels of psychrotrophic bacteria (between 10^6 and 10^7 CFU / g), 12 samples (66.67 %) showed strains of *S. aureus* indicating improper hygienic conditions and/or poor processing, 3 of them (16.66%) had total coliform counts greater than 1×10^3 MPN / g and 1 (5.55%) fecal coliform. Only 1 sample (5.55%) was ordered for consumption due to the presence of Salmonella in a sample of 25g. All samples positives for Salmonella spp. and *S. aureus* during microbiological testing were confirmed by molecular methods in PCR.

Keywords: ground beef; microbiological analysis; quality; sources of contaminants

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
SUMÁRIO	5
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ANEXOS	9
1. INTRODUÇÃO COM REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1. A carne bovina e seu consumo no Brasil	10
1.2. Fatores que afetam a qualidade da carne	11
1.3. Avaliação microbiológica da carne moída	13
1.4. A carne moída: contaminação e micro-organismos patogênicos	16
1.5. Biologia molecular aplicada ao processamento de carnes	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. JUSTIFICATIVA	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Coleta e preparo das amostras para as análises microbiológicas	23

4.2. Análises microbiológicas	23
4.3. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas	23
4.4. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes	24
4.5. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp.	27
4.6. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	28
4.7. Análises moleculares	29
4.7.1. Extração de DNA	30
4.8. Oligonucleotídeos utilizados e PCR qualitativo	30
4.8.1. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR	30
4.8.2. PCR qualitativo	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Coleta das amostras	33
5.2. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas	34
5.3. Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. e de <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	39
5.4. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	42
5.5. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	44
5.6. Análise molecular	47
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

E. coli- *Escherichia coli*

g- grama

NMP/g- Número mais provável por grama

µl -microlitros

mg - miligramas

min – minutos

mL – mililitros

mm – milímetros

pH- potencial hidrogeniônico

S. aureus- *Staphylococcus aureus*

UFC/g- Unidade Formadora de Colônia por grama

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.-----	26
Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.-----	31
Tabela 3. Características dos oligonucleotídios utilizados neste estudo.-----	31
Tabela 4. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de carne moída bovina -----	37
Tabela 5. Contagem de bactérias <i>Staphylococcus</i> spp. e de bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> nas amostras de carne moída bovina -----	40
Tabela 6. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de carne moída bovina -----	43
Tabela 7. Resultado de pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. nas amostras de carne moída -----	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org). -----	29
Figura 2. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras de carne moída bovina (Nota: 1,00E+03 significa $1,0 \times 10^3$ UFC/g) -----	35
Figura 3. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de carne moída na primeira e na segunda semana de coleta dos supermercados (Nota: 1,00E+03 significa $1,0 \times 10^3$ UFC/g). -----	38
Figura 4. Contagem de bactérias <i>Staphylococcus</i> spp. de nas amostras de carne moída na primeira segunda e terceira semana de coleta dos supermercados -----	42
Figura 5. Resultado das colônias puras suspeitas de serem <i>Salmonella</i> spp. no Ágar TSI -----	46
Figura 6. PCR para detecção dos genes <i>femA</i> e <i>inv</i> . No gel n. 1 foi utilizado o par de oligos Lary_femA_F e Lary_femA_R e no gel n. 2 Lary_invA_F e Lary_invA_R. M = marcador de 100pb. -----	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Seleção dos oligonucleotídeos utilizados no estudo, com uso do BLAST -----	56
---	----

1. INTRODUÇÃO COM REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A CARNE BOVINA E SEU CONSUMO NO BRASIL

Carne pode ser definida como qualquer tecido animal utilizável como alimento, sendo classificada em carne vermelha, de ave, de pescado e de caça. As carnes podem ser adquiridas como produtos frescos, congelados, embalados a vácuo, secos, salgados, defumados e enlatados (CARDOSO & ARAÚJO, 2003). O Regulamento da Inspeção Sanitária dos Produtos de Origem Animal RIISPOA (BRASIL, 1997), descreve carnes como “massas musculares maturadas e demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária”.

O Brasil ocupa, atualmente, a posição de maior produtor e maior exportador mundial de carne bovina, tendo um rebanho de 176.610.943 cabeças e produção de 1.700 mil toneladas equivalente-carcaça, destinada à exportação e apresentando, ainda, consumo *per capita* interno de 38,7 kg/pessoa/ano (ARAÚJO *et al.*, 2012). Segundo o Ministério da Agricultura (BRASIL, 2013), a expectativa é que, até 2020, a produção nacional de carnes suprirá até 44,5% do mercado mundial. Entretanto, a qualidade da carne produzida é o principal fator que visa garantir o sucesso das futuras exportações. Dessa forma, a carne é um alimento de amplo consumo em todo o país e está presente, mesmo que em quantidade, qualidade e modo de preparo diferenciado, na dieta da grande maioria da população (FERREIRA & SIMM, 2012).

Dentre as características de qualidade da carne bovina, a maciez assume posição de destaque, sendo considerada como a característica organoléptica de maior influência na aceitação da carne por parte dos consumidores (ALVES, *et al.*, 2005). A carne é uma importante fonte de proteínas essenciais para o organismo, além de se apresentar como um alimento rico em vitaminas do complexo B, minerais e ferro, sendo facilmente digerida, e quando cozida, a carne fornece nutrientes que contribuem significativamente para um equilíbrio dietético das refeições, daí sua importância (SANTO, 2006).

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. À sua condição de transportadora de proteínas de excelente qualidade, somam-se as características organolépticas agradáveis, e quando se comparam seus custos no mercado consumidor, levando em conta seu aporte proteico e calórico, com os de outros alimentos de hierarquia inferior, revela-se um alimento ainda mais barato em nosso país (SALINAS, 2002). Na forma de carne moída, torna-se popular, sendo acessível à faixa da população com menor poder aquisitivo (MOTTA, BELMONTE & PANETTA MOTTA, 2000).

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, aponevroses, tendões, coágulos e nodos linfáticos. Também não é permitido utilizar na sua elaboração matéria prima oriunda de raspa de ossos e carne mecanicamente separada (BRASIL, 2003).

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 proteína de boa qualidade e por ser acessível à população de baixo poder aquisitivo (SILVA, SOUZA & SOUZA, 2004).

1.2. FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DA CARNE

A qualidade pode ser definida como um conjunto de características que irão influir na aceitabilidade de um alimento. Os órgãos do sentido são bastante utilizados para sua escolha, na maioria das vezes, o consumidor, o faz tendo em vista, respectivamente, o preço, a aparência, o sabor e o valor nutritivo (GAVA, SILVA & FRIAS, 2008).

A qualidade final da carne resulta do que aconteceu com o animal durante toda a cadeia produtiva. Devem-se assegurar procedimentos adequados de

transporte, abate, armazenamento, manipulação, exposição e preparo da carne (ALVES *et al.*, 2005).

Os fatores extrínsecos como a espécie, sexo, raça, alimentação e manejo, assim como os fatores intrínsecos (características estruturais, pH, atividade de água, condições de armazenamento e processos *post mortem*) levam a diferenças na qualidade final da carne. A conversão do músculo em carne ocorre a partir das fases de *pré-rigor mortis*, *rigor mortis* e *pós-rigor mortis*, resultado de diferentes graus de degradação enzimática e desnaturação de proteínas, que podem resultar em marcantes variações nas propriedades da carne, como a capacidade de retenção de água, cor e firmeza da carne fresca; maciez, sabor e suculência da carne preparada para consumo, e capacidade de emulsificação das matérias primas, rendimentos de processo e cor dos produtos processados (COUTINHO, 2004).

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 lático, queda de pH e diminuição da quantidade de ATP devido a interrupção da circulação sanguínea. 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).

Na etapa de maturação/pós-rigor, as enzimas proteolíticas da carne denominadas catepsinas decompõem as proteínas promovendo o amaciamento “post-mortem” responsável pela textura da carne. Caso essa decomposição parcial das proteínas denominada maturação da carne tenha continuidade ocorrerá à produção de significativas quantidades de amônia tornando a carne deteriorada e imprópria para o consumo, desse modo, a maturação da carne é considerada um processo determinante no qual se devem tomar cuidados especiais para não afetar a qualidade do produto final (MENDES *et al.*, 2001).

Em nosso país, a maturação é feita em câmaras de 15°C e umidade relativa de 80 a 85% com duração entre 24 e 48 horas, com uma perda de aproximadamente 2% de água. A carne resfriada a temperatura muito abaixo do desejável sofrerá encurtamento da fibra muscular promovendo o seu enrijecimento. Uma das formas de se evitar este encurtamento e garantir a maior segurança

microbiológica é o resfriamento de maneira rápida a temperaturas inferiores a 10°C entre 8 a 15 horas após o abate (SANTO, 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°C a 4°C. O resfriamento da carne bovina e o transporte da mesma são considerados pontos críticos de controle, sendo que o resfriamento adequado inibe a multiplicação de micro-organismos, mas não garante que a carne esteja com qualidade para o consumo (LUNDGREN *et al.*, 2009).

A Portaria de nº 304/96 do Ministério da Agricultura instituiu um programa de distribuição de carnes bovinas ao comércio varejista, envolvendo a padronização de cortes, embalagem, rotulagem e distribuição dos produtos com o propósito de reduzir e dificultar a ação do comércio clandestino, porém infelizmente grande parte dos mercados e açougues espalhados pelo Brasil não seguem as regulamentações da referida portaria, colocando em risco a qualidade da carne distribuída ao consumidor e por consequência, a saúde da população (CONCEIÇÃO, FARIA & GÂNDARA, 2003; MENDES *et al.*, 2001).

1.3. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA CARNE MOÍDA

A alimentação é uma das condições básicas para promoção e manutenção da saúde, desde que a produção e a manipulação dos alimentos se deem dentro de padrões higiênico-sanitários satisfatórios (MACHADO, 2009).

Devido à sua variada composição nutricional, elevada atividade de água, pH próximo da neutralidade, dentre outros fatores, a carne é um excelente meio para a proliferação de micro-organismos que, quando não são bem controlados, podem causar tanto prejuízos de ordem econômica quanto 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 micro-organismos procedentes da faca de sangria, do couro, do trato intestinal, dos manipuladores, do meio ambiente, dos recipientes, equipamentos e utensílios. Logo a contaminação da carne por

micro-organismos poderá colocar em risco a saúde do consumidor, afetar a qualidade da carne e o seu tempo de conservação (CHESCA *et al.*, 2001).

Quando carnes frescas são examinadas em nível de varejo, diversos tipos e quantidades diferentes de micro-organismos são encontrados. Carnes moídas comercializadas, originárias de vários cortes e manipuladas excessivamente, contêm altos níveis de contaminação microbiana. A carne moída tem uma grande superfície de contato, o que contribui, em parte, para o aumento da flora microbiana. Essa maior superfície favorece o crescimento de bactérias aeróbias, que frequentemente causam deterioração em baixas temperaturas (JAMES, 2005).

A carne pode ser contaminada por bactérias como a *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Enterococcus*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Listeria*, leveduras e mofos. Muitos destes micro-organismos podem causar doenças e problemas à saúde pública, acarretando desde um simples desconforto intestinal até mesmo a morte (GERMANO & GERMANO, 2003). No caso da contaminação por bactérias saprófitas há diminuição da vida útil do produto, gerando perdas econômicas (FERREIRA, 2008).

No caso da carne moída, a moagem é um fator adicional que pode favorecer a contaminação e a multiplicação de micro-organismos. Os fatores que mais colaboram com a contaminação do produto são o uso de equipamentos e instalações 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 (ALMEIDA, GONÇALVES & FRANCO, 2002; OLIVEIRA, NASCIMENTO & FIORINI, 2002).

Os manipuladores representam um dos principais veículos de contaminação da carne, uma vez que sua participação chega a atingir até 26% dos surtos de toxinfecção alimentar. Desse modo, medidas preventivas devem estar relacionadas à higiene pessoal na manipulação, ao adequado preparo e armazenamento de alimentos (ANDRADE & BRABES, 2003).

Entretanto, no Brasil, os trabalhadores do setor de carnes possuem baixos níveis social e cultural. Este quadro exige grande atenção e dedicação a esses profissionais, para que os hábitos mais elementares 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 (EPI's) 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 literatura relata pesquisas que obtiveram resultados preocupantes quanto ao nível de contaminação das carnes, dos equipamentos, utensílios e manipuladores, assim como pela adoção de práticas inadequadas de manipulação de alimentos (ALMEIDA, 2010). 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 micro-organismos (JAMES, 2005).

A higienização dos equipamentos e utensílios deve se proceder de forma rigorosa para não se transformarem em potenciais riscos devido às dificuldades apresentadas no decorrer do processo de higienização, pelo acúmulo de matéria orgânica que acaba levando à formação de biofilme (MACHADO *et al.*, 2004).

A maneira mais eficiente de reduzir a contaminação e crescimento microbiano em carne é estabelecer programas de controle de qualidade como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos de Pontos Críticos de Controle (APPCC), que podem ser realizadas, buscando micro-organismos indicadores que preveem a presença de patógenos e bactérias que causam a deterioração (BARROS, NERO & MONTEIRO, 2007).

Os micro-organismos indicadores são aqueles que quando presentes nos alimentos podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO & LANDGRAF, 2004). A pesquisa dos micro-organismos em alimentos pode ser realizada por métodos tradicionais para sua enumeração, objetivando especificar determinados grupos ou espécies microbianas e normalmente são concluídos num período médio de sete dias.

Embora a legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabeleça limites de tolerância para o grupo de micro-organismos psicotróficos e mesófilos, populações elevadas desse grupo representam qualidade higiênica sanitária deficiente, devido a má qualidade da matéria-prima aliada a tempo e temperatura de estocagem inadequada. Quando populações mesofílicas e psicotróficas ultrapassam 10^6 UFC/g, a vida de prateleira deste produto torna-se comprometida (SILVA & GANDRA, 2001).

Ademais, a legislação Brasileira vigente preconiza análises microbiológicas nos produtos cárneos, a fim de avaliar as condições higiênico-sanitárias desses produtos e a possível presença de micro-organismos patogênicos através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 02/01/2001, da Agência nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001).

1.4. A CARNE MOÍDA: CONTAMINAÇÃO E MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS

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 em suas últimas refeições. Sendo assim, torna-se difícil rastrear os alimentos responsáveis pelas toxinfecções ocorridas (FORSYTHE, 2000).

A maioria dos surtos de toxinfecções é decorrente do consumo de alimentos, especialmente os crus e os 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 micro-organismos deteriorantes e patogênicos para os

alimentos manipulados com falhas de processamento (COSTA *et al.*, 2008; SOUSA, *et al.*, 2012).

Visando a segurança dos alimentos, os parâmetros microbiológicos adotados pela resolução RDC n° 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) para a carne moída bovina compreendem a contagem de coliformes termotolerantes, de *Staphylococcus* coagulase positivo e a pesquisa de *Salmonella* em 25 g de amostra.

Os coliformes termotolerantes ou coliformes fecais constituem um grupo de enterobactérias capazes de fermentar a lactose a 45°C com produção de gás e ácido, se tratam de bastonetes gram-negativos e anaeróbios facultativos. Tais micro-organismos são frequentemente encontrados no solo, água contaminada e trato intestinal de humanos e outros animais. Altas contagens de coliformes termotolerantes indicam falhas higiênicas ao longo do processamento e possibilidade da presença de micro-organismos patogênicos (FRANCO & LANDGRAF, 2004). A bactéria *Escherichia coli* é a principal representante dos coliformes a 45°C, ou seja, 90% dos coliformes termotolerantes são *E. coli* (GUZMÁN *et al.*, 2004; FRANCO & LANDGRAF, 2004).

Dentre os agentes bacterianos, aqueles que estão relacionados e implicados com o maior número de surtos são: *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* Muitos casos de enfermidades transmitidas por alimentos não são notificados, pois seus sintomas são geralmente parecidos com gripes ou discretas diarreias e vômitos. Dentre os sinais e sintomas mais comuns tem-se dor de estômago, náuseas, vômitos, diarreia e febre por período prolongado (AMSON, HARACEMIV & MASSON, 2006).

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 a doença adquirida por alimentos mais comum, sendo considerada uma intoxicação e não uma infecção. A doença é causada pela toxina bacteriana presente no alimento, 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 abrupto e rápido

com presença de vômitos severos, diarreia e dores abdominais (MURRAY, *et al.*, 2006).

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. O principal habitat das salmonelas é o trato intestinal de aves, répteis e seres humanos. Geralmente, os alimentos são contaminados pelo contato com águas poluídas e direta ou indiretamente pelas fezes dos animais (GUIMARÃES *et al.*, 2001; FRANCO & LANDGRAF, 2004). A legislação brasileira impõe ausência de *Salmonella* sp. para qualquer amostra de alimento estudada. Segundo a ANVISA (BRASIL, 2001) o resultado da determinação de *Salmonella* sp. deve ser expresso como Presença ou Ausência na alíquota analisada.

A maioria dos micro-organismos, cuja patogenicidade no homem depende da sua presença, sob a forma viável, nos alimentos, são relativamente sensíveis às altas temperaturas e, por isso, são perfeitamente destruídos pela cocção adequada dos alimentos, eventualmente contaminados, ou pelos processos de pasteurização. Encontram-se neste caso as infecções causadas por bactérias não esporuladas, em particular, pelas espécies do gênero *Salmonella*, *Brucella*, *Escherichia* ou o próprio agente da tuberculose, que podem ser perfeitamente destruídas pela pasteurização (GERMANO e GERMANO, 2003).

Desta forma, os consumidores devem ser esclarecidos do risco de adquirir alimentos de origem desconhecida, recebendo informações preventivas e educativas que evitem as toxinfecções e que possibilitem a identificação de alimentos suspeitos ou de má qualidade.

1.5. BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA AO PROCESSAMENTO DE CARNES

As técnicas tradicionais de análise microbiológicas de alimentos baseiam-se no emprego de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas. As técnicas

microbiológicas mais comumente utilizadas são realizadas em meios de cultura não-seletivos e seletivos complementadas por testes bioquímicos diferenciais, na sua maioria, de produção enzimática, usados em conjunto com testes sorológicos.

Os resultados de testes bioquímicos podem apresentar variabilidade pela ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, entre outras dificuldades, tais como o baixo poder discriminatório em micro-organismos com pouca variabilidade genética e o risco de interpretações inadequadas, quando se utiliza um número limitado de testes (DOWNES & ITO, 2001). Por outro lado, a utilização de uma bateria de determinações microbiológicas determina uma análise cara e dispendiosa, pois podem requerer dias para análises dos resultados obtidos (JUSTE, THOMMA & LIEVENS, 2008).

Nas últimas décadas, verificou-se o incremento de técnicas moleculares para a detecção, identificação e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Técnicas genotípicas referem-se à caracterização do DNA cromossômico, plasmidial ou total de um micro-organismo, que são caracterizadas pelo rápido resultado e pela estabilidade da molécula de DNA (POSTOLLEC *et al.*, 2011).

As técnicas moleculares têm aplicação direta na detecção e caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Dentre essas, destacam-se as de amplificação de sequências do DNA pela reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) (JOSEFSEN *et al.*, 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica altamente sensível, na qual pequenas quantidades de sequências de DNA ou RNA específicas podem ser enzimaticamente amplificadas pela enzima Taq polimerase (enzima derivada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*) até que sejam obtidas, por estratégia de clonagem *in vitro*, milhões de cópias da sequência alvo. Por isso, a PCR tornou-se a técnica de biologia molecular mais utilizada em diagnóstico microbiológico (MALORNY *et al.*, 2003).

Ensaio com PCR têm sido desenvolvidos para detecção simultânea de *Salmonella spp* em carne de porco, bovina e de ave, verificando um limite de detecção de uma unidade formadora de colônia por grama de carne (1 UFC g⁻¹) (HYEON *et al.*, 2011)

A caracterização molecular de um dos genes de invasão de *Salmonella*, um componente essencial para a patogênese da doença, revelou a presença do locus

genético, denominado *inv*, como o primeiro de um operon de genes arranjados na mesma unidade transcricional, que codificaria proteínas relacionadas com invasão celular. Os grupos de genes *inv*, denominados A, B, C, D e E estão presentes na maioria das salmonelas e ausentes na região correspondente de *E. coli*, sendo considerados capazes para distinguir entre *Salmonella* e outras espécies bacterianas por meio de PCR (CHEN & GRIFFITHS, 2001).

Pesquisadores já analisaram molecularmente o locus *inv* em amostras de carne para detecção de *Salmonella*. Um método de PCR multiplex foi desenvolvida para a detecção simultânea de *Salmonella* spp (região *inv* A), *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* O157:H7 em amostras de carne. A sensibilidade de detecção de DNA por este método foi de 10^3 UFC/mL para cada agente patogênico. Neste estudo também foi digno de nota a excelente concordância para os resultados de multiplex PCR e o método de cultura convencional, o que sugere que o multiplex PCR é um método confiável e útil para a detecção rápida contaminação de carne com *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 (KAWASAKI *et al.*, 2005).

Experimentos delineados para a detecção e identificação de *S. aureus* presente em carnes, utilizando PCR, também estão descritos na literatura. Uma PCR múltipla permitiu uma identificação rápida de 19 genes que codificam enterotoxinas em carnes de porco e galinha na Coreia (HWANG *et al.*, 2007).

Por outro lado, alguns genes presentes em estafilococos, denominados genes auxiliares ou fatores essenciais gene *fem* (*factor essential for methicilin resistance*), auxiliam outro gen, o *mecA* a expressar um alto nível de resistência aos beta-lactâmicos. Foram identificados muitos desses genes *fem*, denominados *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* e *femF*. O gene *femA* é essencial para a expressão da resistência dos estafilococos resistentes à meticilina (MRSA) e parece diferenciar *S. aureus* de outras espécies de estafilococos. Os genes *femA* e *mecA* têm sido detectados em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina/oxacilina por meio de técnicas moleculares como a reação de polimerase em cadeia (PCR), sendo que a ocorrência de *S. aureus* medida pela PCR do gene *femA* também já foi descrita em análises de queijos e produtos cárneos (PELISSER *et al.*, 2009) .

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade microbiológica da carne moída bovina comercializada nos mercados varejistas das cidades de Brasília e Taguatinga – DF.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características microbiológicas da carne moída bovina;
- Realizar genotipagem bacteriana por técnica de PCR;
- Verificar a conformidade dos resultados encontrados com os parâmetros exigidos por legislação específica e com os dados existentes na literatura.

3. JUSTIFICATIVA

Alimentação é uma das condições básicas para promoção e manutenção da saúde, desde que a produção e a manipulação dos alimentos se deem dentro de padrões higiênico-sanitários satisfatórios (MACHADO, 2009). As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são um perigo de grande relevância para a saúde humana e para a economia dos indivíduos, famílias e nações (FREITAS *et al.*, 2006).

A carne, por suas características intrínsecas, constitui excelente meio para o desenvolvimento de micro-organismos, podendo ser responsável pela transmissão de bactérias patogênicas para o homem (DIAS *et al.*, 2008). A alta contagem microbiana na carne pode ser proveniente do abate dos animais doentes ou portadores de bactérias patogênicas, mas, também pela manipulação em ambientes com condições precárias de higiene, condições inadequadas de temperatura no armazenamento e higiene inadequada dos manipuladores (SOUZA *et al.*, 2009).

A carne moída 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 adversas condições de higiene e ambiente (FERREIRA, 2008).

Nesse contexto, a RDC nº 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária padroniza os parâmetros microbiológicos nos alimentos visando reduzir surtos de infecções alimentares e problemas de saúde pública. Portanto, o presente trabalho visa avaliar a qualidade microbiológica de um produto alvo de contaminação microbiana, contribuindo com informações acerca da qualidade da carne moída adquirida em mercados de grande volume no Distrito Federal, indicando uma possível vulnerabilidade na segurança alimentar da população consumidora deste alimento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As amostras de carne moída bovina embaladas em bandejas de isopor revestidas com filme plástico, expostas ao consumo foram coletadas em 6 diferentes supermercados das cidades de Brasília e Taguatinga, por 3 semanas consecutivas, durante o período de Julho a Agosto de 2013, totalizando 18 amostras. No laboratório, em ambiente asséptico, foi pesado 25 g da amostra colhida e colocada em um erlenmeyer contendo 225 ml de água peptonada a 0,1%, estéril. O material do erlenmeyer foi homogeneizado por 20 minutos, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição foram realizadas 3 diluições decimais (10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}), e para isso, pipetou-se, assepticamente, 1 ml da diluição 10^{-1} para um tubo de ensaio contendo 9 ml de água peptonada a 0,1% estéril, obtendo-se a segunda diluição (10^{-2}). Procedeu-se da mesma forma para preparar as demais diluições até a diluição 10^{-4} .

4.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises bacteriológicas realizadas foram: contagem total dos microorganismos aeróbios mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* sp, pesquisa de *Salmonella* spp. e extração de DNA bacteriano com amplificação de sequências do DNA por técnica de PCR.

4.3. CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS E PSICOTRÓFICAS

Para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo composto por extrato de carne 10 g/L, peptona 10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L e ágar 15 g/L em pH $7,30 \pm 0,2$. Espalhou-se uniformemente o inoculo sobre a superfície do meio, até completa absorção, com o auxílio de alça de Drigalski esterilizada. As placas para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas foram incubadas em posição invertida, a 37°C por 24 horas e as placas para contagem total de bactérias aeróbias psicotróficas, foram incubadas em posição invertida, a $7^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. 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).

4.4. 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 totais, inoculou-se 1 ml de cada diluição em uma série de 3 tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo lactosado (lactose 0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v)) e tubos de Durham invertidos e a incubação foi realizada a 37°C durante 24-48 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção

de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais.

Alíquotas dos tubos positivos no caldo lactosado foram transferidas para tubos contendo caldo verde brilhante e bile bovina 2% HIMEDIA[®] e tubos de Durham invertidos que foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás nos tubos de Durham indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais.

A partir do número de tubos positivos no caldo verde brilhante e bile bovina 2% e com o auxílio de uma tabela de NMP (Tabela 1), foi obtido o número mais provável de coliformes totais por grama da amostra (NMP/g). Para coliformes termotolerantes, alíquotas dos tubos de caldo verde brilhante e bile bovina 2% com produção de gás, foram transferidas para tubos contendo caldo EC SYNTH[®] (caldo *Escherichia coli*) e tubos de Durham invertidos e a incubação foi realizada em banho-maria a 45°C por 24 horas.

A presença de gás nos tubos de Durham indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes. Por meio da tabela de NMP (Tabela 1) e baseado no número de tubos de caldo EC com produção de gás foi obtido o NMP de coliformes termotolerantes por grama da amostra (NMP/g).

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

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

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

4.5. CONTAGEM DE *Staphylococcus spp.*

Para a contagem de *Staphylococcus spp.*, inoculou-se 0,1 ml de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Base Sal. Espalhou-se uniformemente o inóculo sobre a superfície do meio, com o auxílio de alça de Drigalski esterilizada. As placas foram incubadas em posição invertida, a 37°C por 48 horas. 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 g de amostra (UFC/g).

O meio de cultivo Agar Base Sal era composto por extrato de carne 10 g/L, peptona 10 g/L, cloreto de sódio 75 g/L e ágar 15 g/L. A adição de cloreto de sódio 7,5% (p/v) torna o meio de cultivo seletivo para as espécies de *Staphylococcus spp.*, que tem a capacidade de se multiplicar em uma concentração de cloreto de sódio de até 15% (p/v) e inibe a microflora acompanhante.

Para confirmação do gênero *Staphylococcus spp.* foram preparados esfregaços das colônias corados pelo método de Gram para observação dos microrganismos em forma de cocos, agrupados em cachos e Gram positivos. Posteriormente as colônias foram submetidas à prova da catalase, onde uma alíquota do cultivo foi transferida para uma lâmina contendo uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) e a formação de bolhas indicou prova positiva para catalase. O gênero *Staphylococcus spp* produz a enzima catalase e faz uma reação positiva nesse teste.

As colônias do gênero *Staphylococcus spp.* foram transferidas para tubos contendo o meio de cultivo seletivo e diferencial Agar Sal Manitol OXOID®. As colônias típicas de *Staphylococcus aureus* crescem nesse meio e fermentam o manitol produzindo colônias amarelas com zonas amarelas. A maioria das espécies coagulase negativas de *Staphylococcus* e *Micrococcus* não fermentam o manitol e crescem nesse meio como pequenas colônias vermelhas rodeadas de zonas vermelhas ou rosa choque, sendo possível obter um resultado presuntivo para as espécies de *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2010).

4.6. PESQUISA DE *Salmonella* spp.

A diluição 10^{-1} das amostras em água peptonada 0,1% foi incubada à temperatura de 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação (24 horas), pipetou-se 1 ml das alíquotas do caldo de pré-enriquecimento para tubos de ensaio contendo 10 ml de caldo selenito cistina. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo.

Após o enriquecimento seletivo, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semeou-se em estrias para isolamento, com alças de platina, as placas de Petri contendo o meio sólido seletivo e diferencial Ágar Salmonella Shigella (Ágar SS). As placas foram incubadas invertidas, a 37°C por 24 horas. Como resultado presuntivo foi observado se houve crescimento no Ágar SS de colônias típicas de *Salmonella* spp. (colônias incolores, tendendo ao amarelo, podendo ter centro negro).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em ágar CLED (meio rico não seletivo, mas diferencial para bactérias fermentadoras de lactose) 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).

Para o preparo do Agar TSI em tubos o ágar fundido é deixado solidificar, formando uma superfície inclinada. Essa configuração origina duas câmaras de reação dentro do mesmo tubo. A porção inclinada, exposta em toda sua superfície ao oxigênio atmosférico, é aeróbia. A porção inferior, denominada base do tubo, está protegida do ar e é relativamente anaeróbia. Todas as bactérias pertencentes à

família *Enterobacteriaceae* são anaeróbicas facultativas e utilizam carboidratos, efetuando a fermentação ácida mista (ANVISA, 2010).

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 (A/A) e geralmente é possível detectar a presença de gás (CO₂) pela formação de bolhas e/ou fragmentação do meio. Quando a superfície do meio está vermelha e a base amarela (V/A) significa que ocorreu fermentação apenas da glicose (ficando a lactose e a sacarose sem fermentação). Os micro-organismos 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 H₂S como *Salmonella* (ANVISA, 2010).

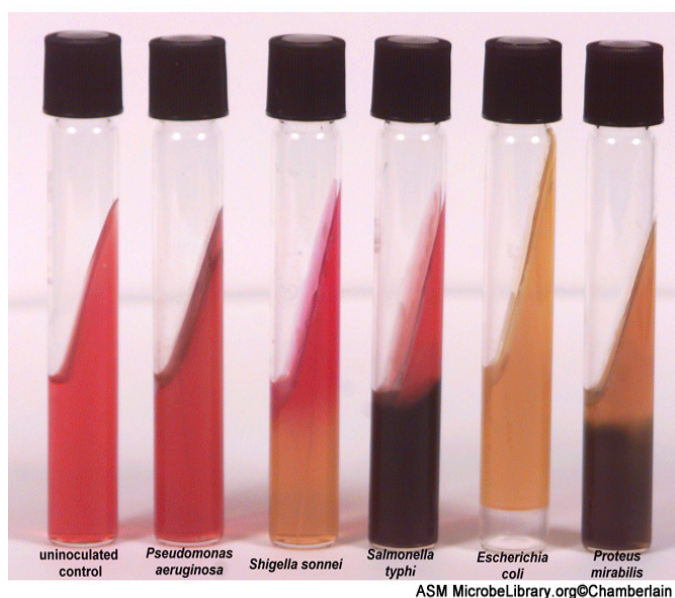


Figura 1. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).

4.7. ANÁLISES MOLECULARES

4.7.1 Extração de DNA

A extração de DNA total dos isolados de *S. aureus* e de *Salmonella ssp*, conformados na análise microbiológica, foi realizada de acordo com o protocolo descrito no kit Plasmid DNA purification MACHEREY-NAGEL® com modificações.

Inicialmente, transferiu-se uma alçada da cultura de cada um dos isolados em 8 ml de caldo de cultivo LB e incubou-se a 37°C por 24h. Centrifugou-se cada amostra contendo bactérias (2500 rpm por 10 min.) e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se, em cada amostra, 250 µL do tampão A1 e homogeneizou-se. Em seguida, adicionou-se 200 µL do tampão A2. Misturou-se a amostra 10 vezes, homogeneizou-se novamente e incubou-se a temperatura ambiente por 5 min. Completou-se com tampão A3 e centrifugou-se por 5 min. a 11000g. O sobrenadante foi passado por uma coluna de sílica e centrifugou-se por 1 min. Adicionou-se 500 µL de tampão AW aquecido à 50°C e centrifugou por 1 min. Adicionou-se 600µL de tampão A4 e centrifugou-se a 1000g por 3 min.

Por fim, 50µL do tampão AE foi adicionado ao centro da coluna. A amostra desta última lavagem continha o DNA purificado. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 1% e comparado com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

4.8. OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS E PCR QUALITATIVO

4.8.1. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões a serem analisadas para *S. aureus* e *Salmonella ssp* foi realizada conforme revisão na literatura e optou-se por duas regiões gênicas espécies específicas, a femA e a invA, respectivamente.

Com a descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas no programa BLAST

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - vide ANEXO 1), 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 na 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	170 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), para verificar a formação de dímeros, dobramento (hairpin) e ΔG de formação de híbridos. Os primers obtidos específicos para este estudo estão listados na tabela 3.

Tabela 3. Características dos oligonucleotídios utilizados neste estudo.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Produto estimado	Espécie
Lary_femA_F	GCAGTGCCCTGGGAAATGA		
Lary_femA_R	CGTCATGATATTCCGCCCCA	107pb	<i>S. aureus</i>
Lary_invA_F	TGGATTTGTCTCCGCTCTG		
Lary_invA_R	CGTCATGATATTCCGCCCCA	155 pb	<i>Salmonella</i> <i>ssp</i>

4.8.2. PCR qualitativo

As condições de termociclagem foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 2 minutos e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, seguida de 60°C por 30 segundos, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 segundos para a extensão dos fragmentos. O equipamento utilizado foi o termociclador Techne modelo TC-512.

Foram utilizados 2,5 µL de tampão 10 vezes (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5 U/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.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Para a realização deste estudo foram coletadas 18 amostras de carne moída bovina embaladas em bandejas de isopor expostas ao consumo em 6 diferentes supermercados das cidades de Brasília e Taguatinga, no período de três semanas consecutivas entre os meses de Julho e Agosto de 2013.

As amostras 1, 2 e 3 eram provenientes de um supermercado de grande rede situado na cidade de Taguatinga e representam, respectivamente, à primeira, segunda e terceira coleta. As amostras 4, 5 e 6 eram provenientes de outro supermercado de grande rede situado na cidade de Taguatinga e representam, respectivamente, à primeira, segunda e terceira coleta. As amostras 7, 8 e 9 eram provenientes de outro supermercado de menor porte também situado em Taguatinga e representam, respectivamente, à primeira, segunda e terceira coleta.

Já as amostras 10, 11 e 12 eram provenientes de um supermercado de rede de menor porte situado na cidade de Brasília (Plano Piloto) e representam, respectivamente, à primeira, segunda e terceira coleta. As amostras 13, 14 e 15 eram provenientes de outro supermercado de menor porte também situado na cidade de Brasília (Plano Piloto) e representam, respectivamente, à primeira, segunda e terceira coleta. E finalizando, as amostras 16, 17 e 18 eram provenientes de outro supermercado situado na cidade de Brasília (Plano Piloto) e representam, respectivamente, à primeira, segunda e terceira coleta.

5.2. CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS AERÓBIAS MESÓFILAS E PSICOTRÓFICAS

A legislação brasileira não estabelece um padrão para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas na carne crua. A contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos é comumente empregada para indicar a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos. Um número elevado desses micro-organismos indica um risco aumentado da presença de patógenos e da fase inicial de deterioração, com perdas de qualidade sensorial e nutricional do alimento (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

De acordo com FRANCO e LANDGRAF (2004) contagens de bactérias aeróbias mesófilas na carne crua entre 10^3 e 10^6 UFC/g indicam um produto sem deterioração microbiana. Já carnes contendo concentrações bacterianas entre 10^6 e 10^7 UFC/g estão com a qualidade comprometida, com início de deterioração e possível detecção de odores desagradáveis. Acima de 10^8 UFC/g a carne já apresenta sinais de deterioração, com a presença de odores desagradáveis. Segundo SILVA (2002), isto ocorre porque a partir dessa concentração bacteriana, o suprimento de glicose da carne acaba e as bactérias começam a utilizar aminoácidos como substrato para seu crescimento. A degradação destes componentes provoca o aparecimento de odores sulfídricos e de ésteres ácidos.

A legislação argentina (ARGENTINA, 2005) estabelece como próprio para consumo a contagem total de bactérias aeróbias mesófilas na carne crua de $5,0 \times 10^5$ UFC/g, aceitável para consumo a contagem entre $5,0 \times 10^5$ e $5,0 \times 10^6$ UFC/g e insatisfatório para consumo a contagem acima de $5,0 \times 10^6$ UFC/g. O Código Sanitário do Estado de São Paulo (SÃO PAULO, 1992) estabelece padrões microbiológicos para contagem total de bactérias aeróbias mesófilas em carnes frescas, sendo o máximo permitido de $3,0 \times 10^6$ UFC/g.

A figura 2 apresenta os resultados da contagem total de bactérias aeróbias mesófilas das 18 amostras de carne moída bovina analisadas neste trabalho. De acordo com a legislação argentina (ARGENTINA, 2005), 13 amostras (72,23%) mostraram contagens de bactérias aeróbias mesófilas próprias para o consumo (até $5,0 \times 10^5$ UFC/g) e 5 amostras (27,77%) mostraram contagens de bactérias aeróbias

mesófilas aceitáveis para o consumo (entre $5,0 \times 10^5$ e $5,0 \times 10^6$ UFC/g). Nenhuma amostra estava imprópria para o consumo.

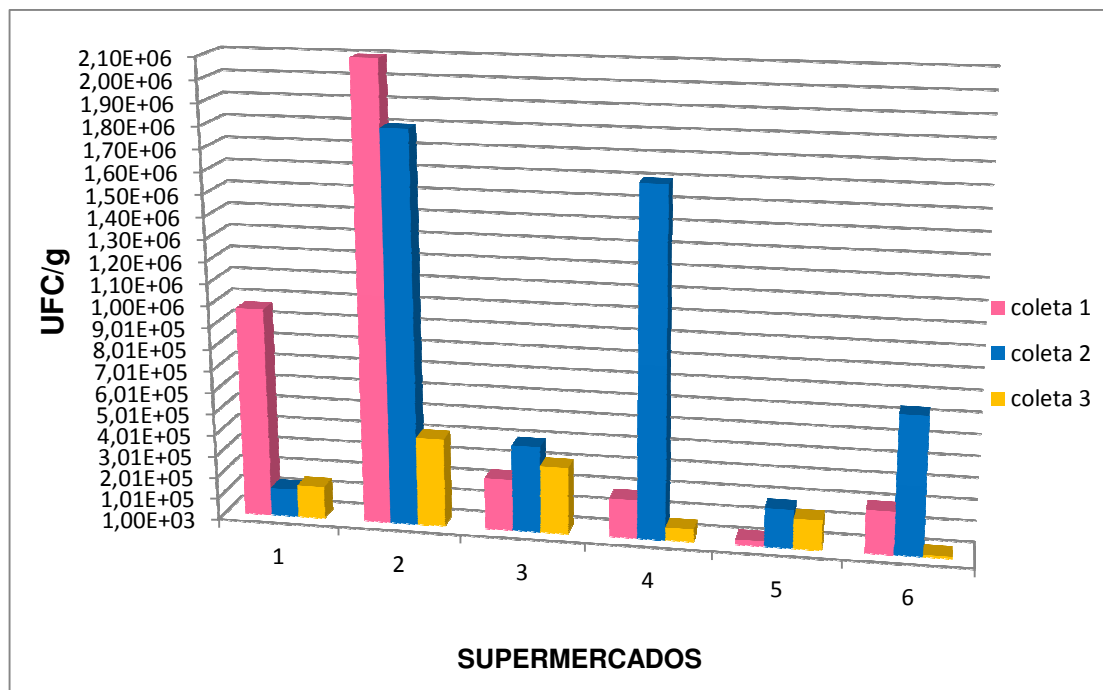


Figura 2. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras de carne moída bovina (Nota: 1,00E+03 significa $1,0 \times 10^3$ UFC/g)

Segundo MORTON (2001) contagens de bactérias aeróbias mesófilas acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g em carne moída fresca comprometem os produtos em relação à sua qualidade higiênico-sanitária. Considerando esse padrão mais rígido, das 18 amostras de carne moída bovina analisadas neste trabalho somente 3 amostras (16,67%) estavam com contagens abaixo de $1,0 \times 10^5$ UFC/g, enquanto que as outras 15 amostras (84,33%) estavam com contagens acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g.

Trabalhos semelhantes a este como o de MOTTA et al. (2000) que analisaram 15 amostras de carne moída, verificaram que 60% das amostras apresentaram contagem de mesófilos superior a 10^6 UFC/g e 13% superior a 10^7 UFC/g. ALMEIDA et al. (2010) analisaram 15 amostras de acém moído resfriado e adquirido em 15 açougues na cidade de Diamantina, MG, provenientes de estabelecimentos ilegais. Os autores relataram que 80% das amostras de carne moída apresentaram contagens de mesófilos superiores a 10^5 UFC/g. Já MARCHI et al. (2012) analisaram 30 amostras de carne bovina moída, adquiridas em 10 diferentes supermercados e açougues, escolhidos aleatoriamente, localizados na

cidade de Jaboticabal, SP. Este estudo observou uma média de população de mesófilos na ordem de 10^5 UFC/g, no entanto 20% das amostras apresentaram uma população entre 10^6 e 10^8 UFC/g.

Desta forma, a elevada população de bactérias mesófilas nos estudos citados acima indica que houve possibilidade de multiplicação microbiana no alimento, inclusive de patogênicos, determinando o risco sanitário deste alimento. À medida que a população desses micro-organismos aumenta, incrementa-se também a possibilidade de existirem micro-organismos patogênicos e a presença de toxinas resultantes do metabolismo microbiano (APHA, 2001).

Os micro-organismos aeróbios psicotróficos em número elevado são responsáveis pela diminuição da vida de prateleira dos alimentos refrigerados, por constituírem seus principais deterioradores (BARTOLOMEU et al., 2011). Pelos padrões estabelecidos pela *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF, 1986) permite-se uma contagem máxima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g de micro-organismos aeróbios totais para os alimentos em geral.

A tabela 4 mostra os resultados da contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas amostras de carne moída bovina. É possível observar que das 18 amostras de carne moída bovina analisadas, somente as amostras correspondentes à terceira semana de coleta de todos os supermercados mostraram contagens altas de bactérias psicotróficas (entre 10^6 e 10^7 UFC/g), gerando resultados discrepantes em relação às demais amostras. Possivelmente naquela semana, por situações desconhecidas dos autores deste trabalho, houve variação com aumento da temperatura da geladeira onde essas amostras foram cultivadas.

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

Amostras de carne moída bovina	Bactérias mesófilas (UFC/g)	Bactérias psicrotróficas (UFC/g)
1	9,7x10 ⁵	5,9x10 ⁵
2	1,3x10 ⁵	9,7x10 ⁴
3	1,5x10 ⁵	3,1x10 ^{6*}
4	2,1x10 ⁶	7,4x10 ⁵
5	1,8x10 ⁶	9,4x10 ⁴
6	4,1x10 ⁵	1,0x10 ^{7*}
7	2,4x10 ⁵	1,2x10 ⁵
8	4,0x10 ⁵	3,2x10 ⁵
9	3,1x10 ⁵	9,3x10 ^{6*}
10	1,8x10 ⁵	3,1x10 ³
11	1,6x10 ⁶	1,0x10 ⁵
12	6,0x10 ⁴	9,5x10 ^{6*}
13	2,5x10 ⁴	4,6x10 ⁴
14	1,8x10 ⁵	7,4x10 ⁴
15	1,4x10 ⁵	8,4x10 ^{6*}
16	2,0x10 ⁵	9,2x10 ³
17	6,4x10 ⁵	6,9x10 ⁵
18	9,7x10 ³	7,2x10 ^{6*}

De acordo com a legislação argentina a contagem de mesófilos não deve ultrapassar $5,0 \times 10^6$ UFC/g e de acordo com a ICMSF a contagem de psicrotróficos não deve ultrapassar $1,0 \times 10^7$ UFC/g.

* Amostras pertencentes à terceira semana de coleta.

Normalmente, existe uma correlação positiva entre o número de bactérias mesófilas e psicrotróficas. As bactérias psicrotróficas são um grupo de microorganismos com crescimento visível a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ em 07 a 10 dias. Apesar de se multiplicarem em temperaturas baixas como as de refrigerador, sua temperatura ótima de crescimento costuma variar entre 20 e 35°C . Muitas bactérias psicrotróficas são mesófilas e crescem mais lentamente a temperaturas mais baixas (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

A figura 3 mostra os resultados da contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de carne moída correspondentes a primeira e segunda semana de coleta dos supermercados. Com exceção da amostra 17, as

contagens de bactérias psicotróficas ficaram abaixo da contagem de bactérias mesófilas e todas as amostras mostraram níveis aceitáveis de contagem (entre 10^3 e 10^5 UFC/g), ou seja, inferior ao limite de $1,0 \times 10^7$ UFC/g estabelecido pela ICMSF(1986).

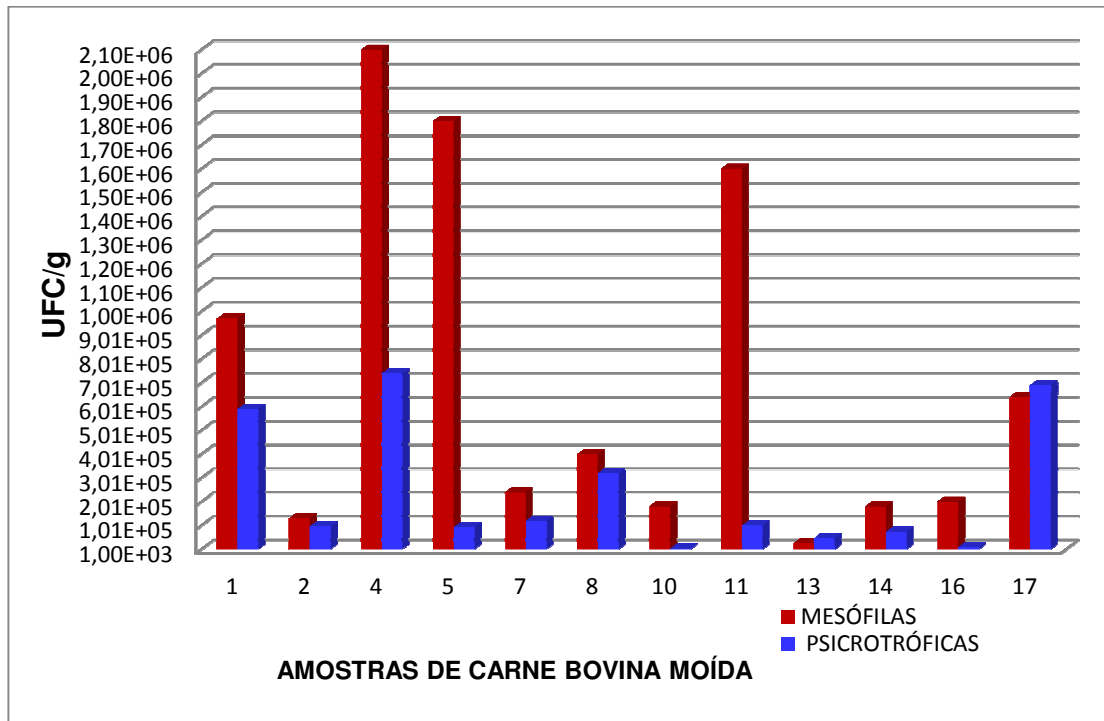


Figura 3. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas nas amostras de carne moída na primeira e na segunda semana de coleta dos supermercados (Nota: 1,00E+03 significa $1,0 \times 10^3$ UFC/g).

Neste estudo, com exceção da terceira semana de coleta, onde todas as amostras mostraram contagens altas de bactérias psicotróficas (entre 10^6 e 10^7 UFC/g), as contagens de micro-organismos psicotróficos para as demais amostras mostraram-se baixas (entre 10^3 e 10^5 UFC/g) em comparação com outros trabalhos existentes na literatura. No estudo de MARCHI et al. (2012), que analisou 30 amostras de carne bovina moída adquiridas em diferentes supermercados e açougues de Jaboticabal, SP, verificou-se que 56,6% das amostras apresentaram altas contagens de micro-organismos psicotróficos, variando de 10^6 a 10^9 UFC/g. Já COSTA et al. (2008) analisaram 40 amostras de carne moída e encontraram populações médias de psicotróficos variando na ordem de 10^4 e 10^7 UFC/g.

5.3. CONTAGEM DE *Staphylococcus* spp. E DE *Staphylococcus aureus*

Para confirmação do gênero *Staphylococcus* spp. das colônias que cresceram no ágar sal foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram. Na visualização em microscópio, só foram consideradas positivas as colônias coradas por Gram que tinham a forma de cocos, agrupadas em cachos e eram gram-positivas. Na prova de catalase todas as colônias previamente selecionadas pela coloração de gram foram positivas, confirmando o gênero *Staphylococcus* spp.

As colônias do gênero *Staphylococcus* spp. foram então transferidas para tubos contendo o meio de cultivo seletivo e diferencial Agar Sal Manitol. Foi considerado resultado positivo para as espécies de *Staphylococcus aureus*, as colônias que fermentaram o manitol do meio produzindo colônias amarelas com zonas amarelas. A tabela 5 mostra os resultados da contagem de bactérias *Staphylococcus* spp. e da contagem de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de carne moída bovina.

Tabela 5. Contagem de bactérias *Staphylococcus spp.* e de bactérias *Staphylococcus aureus* nas amostras de carne moída bovina

Amostras de carne moída bovina	Agar sal (UFC/g) <i>Staphylococcus spp.</i>	Agar sal manitol (UFC/g) (Colônias amarelas) <i>Staphylococcus aureus</i>
1	1,0x10 ²	1,0x10 ²
2	0	0
3	0	0
4	5,0x10 ²	4,0x10 ²
5	3,0x10 ²	2,0x10 ²
6	2,0x10 ²	2,0x10 ²
7	6,0x10 ²	3,0x10 ²
8	4,3x10 ³	4,0x10 ³
9	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³
10	7,0x10 ²	0
11	2,2x10 ³	3,0x10 ²
12	4,0x10 ²	1,0x10 ²
13	1,8x10 ³	3,0x10 ²
14	5,0x10 ²	4,0x10 ²
15	3,0x10 ²	3,0x10 ²
16	1,0x10 ²	0
17	1,0x10 ²	0
18	0	0

O limite máximo aceitável para a contagem de *Staphylococcus aureus* preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001) para produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados como hambúrgueres, almôndegas, quibe e similares, que geralmente levam carne moída em sua composição, é de 1,0 x 10³ UFC/g.

A contagem de *Staphylococcus aureus* em números inferiores a 1,0 x 10³ UFC/g, normalmente, indica condições higiênicas inapropriadas e/ou o processamento deficiente, por se tratar de uma bactéria procedente de manipulação humana inadequada; em números de 10³ a 10⁴ UFC/g, pode significar risco à saúde pública, enquanto que valores próximos a 10⁵ UFC/g indicam risco epidemiológico,

porque esse é o número compatível com o início da produção de enterotoxina, se a linhagem em questão for capaz de produzi-la (MARCHI, 2006).

De acordo com SORIANO et al. (2002) é necessário a presença de aproximadamente 10^5 UFC/g deste micro-organismo no alimento para causar intoxicação alimentar. Embora a carne bovina moída normalmente receba tratamento térmico antes de ser consumida, o risco de intoxicação não está descartado, pois a toxina elaborada pelo *Staphylococcus aureus* é termoestável e um tratamento térmico de 100°C por 30 minutos nem sempre é suficiente para inativá-la.

Neste trabalho das 18 amostras de carne moída bovina analisadas, 12 amostras (66,67%) apresentaram cepas de *S. aureus* indicando condições higiênicas inapropriadas e/ou o processamento deficiente, sendo que 10 amostras (55,56%) apresentaram contagens entre $1,0$ e $4,0 \times 10^2$ UFC/g e somente 2 amostras (11,11%) apresentaram contagens maior ou igual a $1,0 \times 10^3$ UFC/g, podendo indicar risco à saúde pública (Figura 4). No estudo posterior de biologia molecular, todas as amostras foram testadas e foram geneticamente confirmadas como *S. aureus*.

O estudo realizado por SANTOS et al. (2012) na cidade de São Luís –MA, revelou que das 20 amostras de carne moída analisadas, 10 amostras (50%) apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva que variaram de $1,8 \times 10^3$ a $1,2 \times 10^4$ UFC/g. ALMEIDA et al. (2010) analisaram 15 amostras de acém moído proveniente de 15 açougues na cidade de Diamantina, MG e detectaram *Staphylococcus* coagulase positiva em 60% das amostras analisadas, com contagens médias de $2,6 \times 10^6$ UFC/g. Os riscos veiculados pelos alimentos com altas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva são amplos, uma vez que esta bactéria além de ser patogênica para o homem apresenta resistência a determinadas drogas antimicrobianas, agravando sua importância para a saúde pública (ALMEIDA et al., 2010).

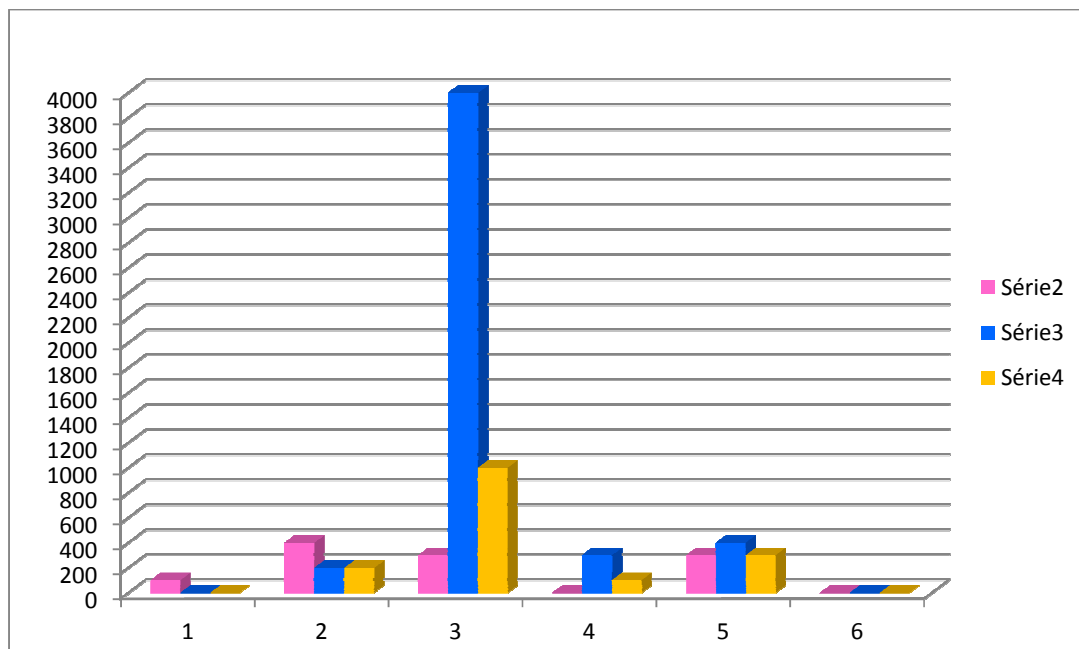


Figura 4. Contagem de bactérias *Staphylococcus* spp. nas amostras de carne moída na primeira, segunda e terceira semana de coleta dos supermercados

5.4. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE COLIFORMES TOTAIS E DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES

A legislação brasileira (BRASIL 2001) não estabelece limites de tolerância para o grupo dos coliformes totais em carne moída. Entretanto, contagens elevadas de coliformes totais indicam falhas higiênicas durante o processamento, havendo ainda a possibilidade da presença de micro-organismos patogênicos de origem fecal e a ocorrência de enteropatógenos (FRANCO & LANDGRAF 2004).

Neste trabalho das 18 amostras de carne moída bovina analisadas, somente 2 amostras (16,66%) apresentaram enumeração de coliformes totais superiores a $1,0 \times 10^3$ NMP/g, indicando condições higiênicas inapropriadas e/ou o processamento deficiente, enquanto que as outras 16 amostras (88,89%) mostraram enumeração menor de coliformes fecais, o que diminui bastante a possibilidade da presença de micro-organismos patogênicos de origem fecal como *E. coli* (Tabela 6).

Tabela 6. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e coliformes termotolerantes nas amostras de carne moída bovina

Amostras de carne moída bovina	Coliformes totais	Coliformes
	(NMP/g) Caldo verde brilhante	termotolerantes (NMP/g) Caldo <i>E. coli</i>
1	23	9,2
2	23	<3
3	240	3,6
4	<3	<3
5	23	<3
6	<3	<3
7	3,6	<3
8	23	<3
9	$1,1 \times 10^3$	23
10	3,6	<3
11	23	23
12	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
13	23	<3
14	<3	<3
15	15	<3
16	23	<3
17	23	3,6
18	3,6	<3

A legislação brasileira (BRASIL, 2001) não apresenta parâmetros para a enumeração de coliformes a 45⁰C em carne moída, porém é possível usar como referência os valores determinados para carne bovina crua preparada e refrigerada cujo limite máximo é $5,0 \times 10^3$ NMP/g. Já para produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados como hambúrgueres, almôndegas, quibe e similares, que geralmente levam carne moída em sua composição, o limite máximo aceitável para a enumeração de coliformes a 45⁰C é de $5,0 \times 10^2$ NMP/g.

Neste trabalho das 18 amostras de carne moída bovina analisadas, somente 1 amostra (5,55%) apresentou contagem de coliformes termotolerantes superior a $1,0 \times 10^3$ NMP/g. (16,66%), podendo ser considerada imprópria para o consumo de acordo com a legislação (BRASIL 2001) para produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados como hambúrgueres, almôndegas, quibe e similares, cujo limite máximo aceitável para a enumeração de coliformes a 45°C é de $5,0 \times 10^2$ NMP/g.

ABREU et al. (2011) analisaram 10 amostras de carne bovina moída provenientes de estabelecimentos comerciais (supermercados e açougues) da cidade de Umuarama, PR, e detectaram que 30% das amostras apresentaram níveis de contaminação por coliformes totais e termotolerantes consideradas preocupantes (acima de 10^3 NMP/g). JÚNIOR et al. (2013) analisaram 25 amostras de carne moída bovina comercializadas em vários municípios de Minas Gerais, e verificaram que todas as amostras apresentaram contaminação por coliformes totais e em 20 amostras (80%) foi detectada a presença de *E. coli*. No trabalho de FOSSATI (2011) as amostras de quibe cru provenientes de cinco restaurantes árabes localizados em Porto Alegre, RS, apresentaram elevadas contagens de coliformes totais de até $4,1 \times 10^5$ UFC/g e contagens médias de coliformes termotolerantes de $1,0 \times 10^3$ UFC/g.

Assim, a presença de coliformes termotolerantes (*E. coli*), em alimentos, indica contaminação com material fecal e pode estar associada à presença de diferentes micro-organismos patogênicos que oferecem riscos à saúde humana, como a *Shigella*, *Vibrio* e *Salmonella* (FRANCO & LANDGRAF, 2004).

5.5. PESQUISA DE *Salmonella* spp.

De acordo com a RDC nº 12 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), bactérias do gênero *Salmonella* devem estar ausentes em 25g de carne moída. Bactérias desse gênero podem causar toxinfecções alimentares, conferindo risco ao consumidor, tornando o alimento impróprio para o consumo.

Neste trabalho das 18 amostras de carne moída bovina analisadas, 5 amostras (27,70%) apresentaram crescimento presuntivo no meio de cultura sólido

seletivo e diferencial Ágar Salmonella Shigella (Ágar SS), caracterizado pela presença de colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento preto (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado de pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras de carne moída

Amostras de carne moída bovina	Agar SS (colônias não fermentadoras de lactose/ pigmento preto)	Agar TSI (superfície do meio vermelho e base amarela ou com pigmento preto) <i>Salmonella</i> spp.
1	Ausente	-
2	Ausente	-
3	Ausente	-
4	Presente	Positivo
5	Ausente	-
6	Ausente	-
7	Ausente	-
8	Presente	Negativo
9	Presente	Negativo
10	Ausente	-
11	Ausente	-
12	Ausente	-
13	Presente	Negativo
14	Presente	Negativo
15	Ausente	-
16	Ausente	-
17	Ausente	-
18	Ausente	-

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento preto do Ágar Salmonella Shigella (Ágar SS) foram então repassadas de forma pura para o Agar TSI. Das 5 amostras positivas repassadas para o ágar TSI, apenas 1 amostra (5,55%), a de número 4, apresentou a superfície do meio vermelho e a base amarela, sem pigmento negro como evidenciado na figura 5. Essa reação no ágar

TSI é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e *Salmonella* (ANVISA, 2010). No estudo posterior de biologia molecular, essa amostra foi geneticamente confirmada como *Salmonella spp.* e portanto estava imprópria para o consumo.

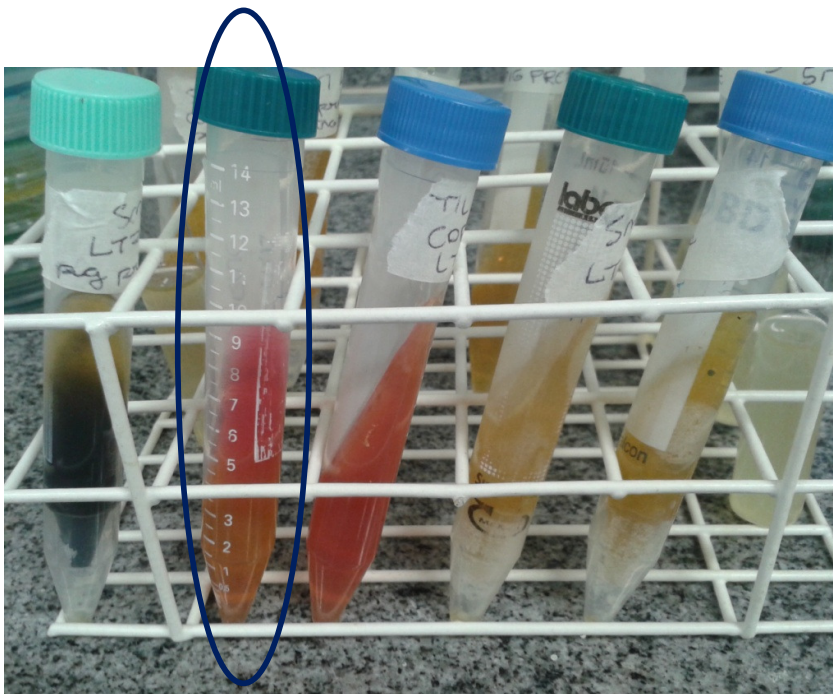


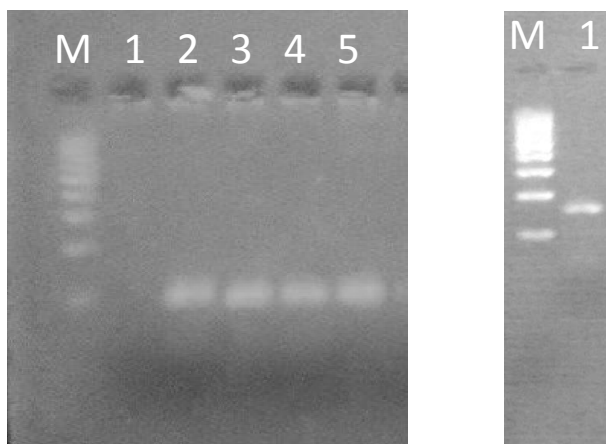
Figura 5. Fotografia demonstrativa das colônias puras suspeitas de serem *Salmonella spp.* no Ágar TSI

No trabalho de SOUSA et al. (2012) foram analisadas 30 amostras de carne moída comercializadas em açougues e supermercados da cidade de Barra do Garças, MT. Deste total, detectou-se em cinco amostras (17%) a presença de *Salmonella spp.*, mostrando que possivelmente estes alimentos sofreram contaminação fecal durante o seu processamento e/ou manipulação. Outros trabalhos como o de DIAS et al. (2008) realizado no estado do Rio Grande do Sul revelaram que, das 24 amostras de carne moída bovina analisadas, somente 1 amostra estava contaminada com *Salmonella spp.* e desta forma não atendia aos padrões microbiológicos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001).

5.6. ANÁLISE MOLECULAR

Foram analisadas duas regiões gênicas: a *femA* e a *invA*, respectivamente de *S. aureus* e *Salmonella ssp.* Em qualquer uma das situações, a amplificação foi espécie específica.

Para o gene *femA*, os oligos utilizados foram Lary_femA_F e Lary_femA_R, nas amostras com conteúdo confirmado na análise microbiológica clássica como *S. aureus*, a banda amplificada correspondia a 107pb (gel n.1, amostras 2 a 5), sendo que a amostra 1, com análise microbiológica referente à *Salmonella ssp* não teve a banda amplificada. Esse padrão de amplificação positiva foi observado para os todos os isolados com análises microbiológicas anteriores identificados por *S. aureus*. Porém no gel de n. 2, a amplificação do gene *invA* (com 157pb), nesta amostra 1, confirmou tratar-se de um isolado de *Salmonella ssp* (figura 3).



Legenda:
M: Marcador/Controle Positivo
1: Amostra de *Salmonella ssp.*
2, 3, 4 e 5: Amostras de *S. aureus*

Figura 6. PCR para detecção dos genes *femA* e *inv*. No gel n. 1 foi utilizado o par de oligos Lary_femA_F e Lary_femA_R e no gel n. 2 Lary_invA_F e Lary_invA_R. M = marcador de 100pb.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que a carne moída bovina comercializada nos mercados varejistas das cidades de Brasília e Taguatinga, carece de qualidade microbiológica e sanitária. Uma das amostras analisadas se apresentou imprópria para o consumo, de acordo com a legislação brasileira, devido à presença da bactéria *Salmonella* spp. confirmada geneticamente em 25g do produto.

Também foi verificado que mais da metade das amostras analisadas (66,67%) mostraram condições higiênicas inapropriadas e/ou o processamento deficiente por apresentarem cepas de *S. aureus*, incluindo 3 amostras (16,66%) com enumerações de coliformes totais superiores a $1,0 \times 10^3$ NMP/g, o que também indica condições higiênicas inapropriadas e/ou o processamento deficiente e 1 amostra (5,55%) com enumeração de coliformes termotolerantes superior a $1,0 \times 10^3$ NMP/g, indicando contaminação com material fecal em nível preocupante.

Ademais, percebe-se uma deficiência na Legislação Brasileira para a carne moída, uma vez que inexistem parâmetros que delimitem a presença de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas, coliformes totais e termotolerantes que indicam a qualidade higiênico-sanitária da carne *in natura*. Como agravante desse fato, os mercados em maioria ainda insistem em desrespeitar as regras higiênico-sanitárias estabelecidas para a manipulação da carne moída. Portanto, observa-se a necessidade de fiscalização frente ao cumprimento da lei e adoção de medidas educativas junto aos trabalhadores do ramo de modo a minimizar os perigos para a saúde do consumidor.

Para estudos futuros, sugere-se uma reformulação do planejamento da amostragem, com a finalidade de promover a análise estatística dos resultados encontrados, realizando-se coletas únicas em duplicatas ou triplicatas. Por esse motivo as amostras dos 6 supermercados coletadas em 3 semanas consecutivas foram tratadas como 18 amostras independentes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, Curitiba, v.10, n.2, p.1-17, 2005.

ABREU, C. O.; MERLINI, L. S.; BEGOTTI, I. L. Pesquisa de *Salmonella* spp, *Staphilococcus aureus*, coliformes totais e coliformes termotolerantes em carne moída comercializada no município de Umuarama - PR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 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.

ALMEIDA, A. S.; GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. *Salmonella* em corte de carne bovina inteira e moída. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.96, p.77-81, 2002.

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.

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

ARGENTINA - **Reglamento (CE) no 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.** Disponível em: http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311306-3/**/DOCE/Rg207305.pdf, acesso: 17/10/2013.

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

ANDRADE, N. J.; BRABES, K. C. da S. **Procedimentos de higienização e biofilmes microbianos na indústria de alimentos.** In: MENDONÇA, R. C. S.; BRABES, K. C. da S.; OLIVEIRA, K. A. M.; VIEIRA, E. N. R. (Orgs.). Microbiologia de alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo. Viçosa: Tribuna, v. 1, p. 145-160, 2003.

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.

ARAÚJO H. S; SABBAG. O. J; MAROTTA, B. T; ANDRIGHETTO, C; URBANO DOS SANTOS, U. Aspectos econômicos da produção de bovinos de corte. **Pesquisa Agropecuária Tropical.** Goiânia, v. 42, n. 1, p. 82-89, 2012.

BARROS, M. F; NERO, L. A; MONTEIRO, A. A. Identificação dos principais pontos de contaminação por microrganismos indicadores de higiene em plantas de processamento de carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.4, p. 856-862, 2007.

BARTOLOMEU, D. A. F. S.; DALLABONA, B. R.; MACEDO, R. E. F.; KIRSCHNIK, P. G. Contaminação microbiológica durante as etapas de processamento de filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*). **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.16, n.1, p. 21-30, 2011.

BECKER, A. K; KIEL, G. Análise microbiológica de carne bovina in natura comercializada em supermercados de Cascavel – PR. **Revista Thêma et Scientia**, v. 1, n. 2, p. 149-155, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação.** Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>> Acesso em 16 de agosto de 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Farmacopeia Brasileira, **Ensaio microbiológicos para produtos não estéreis - Pesquisa de micro-organismos patogênicos - *Staphylococcus aureus***, p. 245, 5ª edição, Brasília, 546p., 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída de Bovino.** Brasília, 2003.

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA, Resolução Nº12 de 02 de janeiro de 2001. **Aprova padrões microbiológicos para alimentos.** Disponível em: www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01_rde.htm. Acesso em 24 de agosto de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **Regulamento de Inspeção Industrial e sanitária de produtos de origem animal** de 29 de março de 1997. RIIISPOA. Rio de Janeiro, 1997.

CARDOSO, L., ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em carnes comercializadas no Distrito Federal no período de 1997-2001. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v. 17, n. 113, p. 12-19, 2003.

CARNEIRO, A. L.; SANTOS, B. F. P. Avaliação microbiológica de carne moída comercializada em açougues de Brasília/DF. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, v. 8, n. 1, p. 33-43, 2010.

CHEN, J.; GRIFFITHS, M. W. Detection of *Salmonella* and simultaneous detection of *Salmonella* and Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using the magnetic capture hybridization polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 7-11, 2001.

CHESCA, A. C.; PEIXOTO, C. P.; COSTA, D. G.; NASCIMENTO, H. N.; PINTO, I. R. A.; GUIMARÃES, J. L. P.; TARQUINIO, L. B.; OKURA, M. H. Levantamento das temperaturas de armazenamento de carnes, em açougues e supermercados de Uberaba, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 84, n. 15, p.51-55, 2001.

CONCEIÇÃO, M. P. J.; FARIA, J. A. F.; GÂNDARA, A. L. Influencia da temperatura de comercialização sobre a microbiota de carne bovina moída, em atmosfera modificada. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.113, p.67-72, 2003.

COSTA, F.N; MOREIRA, A. P. O. Avaliação microbiológica da carne bovina moída comercializada no município de Jaboticabal, SP. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 160, n. 22, p. 62-65, 2008.

COUTINHO, M. C. L. **Parâmetro de qualidade de cortes de carne bovina resfriada comercializada na cidade do Rio de Janeiro.** 2004. Dissertação de Mestrado, Programa de pós-graduação em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2004.

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**, São Paulo, v.75, n.3, p.359-36, 2008.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th. Washington, DC: American Public Health Association, 2001, 676 p.

FARIAS, M. C. A. **Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo em Belém-Pará**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2006.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. Bacteriological Analytical Manual - Chapter 4: **Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**, 2002. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>, Acesso em 25 de junho de 2013.

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**, Pará de Minas, n.3, p. 37 - 61, 2012.

FERREIRA, I. M. **Riscos relacionados à contaminação microbiana de carne moída bovina**. 2008. Dissertação de Mestrado. 45p. Universidade Federal de Uberlândia/Faculdade de Medicina Veterinária, 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2000. 424 p.

FOSSATI, N. A. A. **Avaliação da qualidade microbiológica de quibes crus preparados em restaurantes especializados em culinária árabe**. Dissertação (Especialização em produção, tecnologia e higiene de alimentos de origem animal). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

FREITAS, A.K. **Características da carcaça, da carne e perfil dos ácidos graxos de novilhos Nelore inteiros ou castrados em duas idades**. 2006. 68 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GAVA, A. J.; SILVA, B. A. C.; FRIAS, G. R. J. **Tecnologias de Alimentos: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Editora Nobel, 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2003, 655p.

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

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

HWANG, S. Y. et al. Novel multiplex PCR for the detection of the *Staphylococcus aureus* superantigen and its application to raw meat isolates in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 1, p. 99-105, 2007.

HYEON, J. Y. et al. Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Salmonella* serovars in retail meat products. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 1, p. 161-166, 2011.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 2: **Sampling for microbiological analysis - Principles and specific applications**. Ed. Blackwell Scientific Publications, 1986.

JOSEFSEN, M. H. et al. Food-PCR. Validation and standardization of diagnostic PCR for detection of *Yersinia enterocolitica* and other foodborne pathogens. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 529, p. 443-449, 2003.

JUSTE, A.; THOMMA, B. P.; LIEVENS, B. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 745-761, 2008.

KAWASAKI, S. et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in meat samples. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 3, p. 551-556, 2005.

IBGE/DPE/COAGRO, 2010. **Pesquisa Trimestral do Abate de Animais**. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abateleite-couro-ovos_200901_1.shtm>. Acesso em: 23 de junho de 2013.

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

JÚNIOR, L. C. R. B; OLIVEIRA, M. P; MOREIRA DA SILVA, M. J. F; MARTINS, L. M. Qualidade microbiológica de alimentos de origem animal comercializados na região de Minas Gerais. **VÉRTICES**, Campos dos Goytacazes, RJ, v.15, n. 2, p. 49-59, 2013.

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**, Araraquara, v.20, n.1, p. 113-119, 2009.

MACHADO, J. R; MARSON, J. M; OLIVEIRA, A. C. S; SILVA, P.R; TERRA, A. P. S. Avaliação microbiológica das mãos e fossas nasais de manipuladores de alimentos da unidade de alimentação e nutrição de um hospital universitário. **Revista Medicina**, Ribeirão Preto - USP, v. 42, n.4, p. 461-465, 2009.

MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, 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**, São Paulo, n.7 p. 81 – 87, 2012.

MARQUES, K. P. S. **Efeito da moagem no isolamento de *Yersinia enterocolitica* em carne bovina**. 1991. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 1991.

MENDES, A. C. R.; SANTANA NETA, L. G.; COSTA, D. S.; ALMEIDA, J. F. Condições de comercialização de cortes cárneos em supermercados da cidade de Salvador, BA. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.83, p. 58-62, 2001.

MOTTA M. R. A; BELMONTE M. A; PANETTA J. C. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São

Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n.78/79, p. 59-62, 2000.

MURRAY, P. R ; ROSENTHAL, K. S; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2006. p. 217-224.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. cap. 7, p. 63 – 67.

OLIVEIRA, N. M. S.; NASCIMENTO, L. C.; FIORINI, J. E. Isolamento e identificação de bactérias facultativas mesofílicas em carnes frescas bovinas e suínas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.94, p.68-74, 2002.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848-861, 2011.

PELISSER, M. R. *et al.* Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo , v. 40, n. 1, 2009.

SALINAS, R. D. **Alimentos e nutrição: Introdução à Bromatologia**. 3.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2002.

SÃO PAULO (Estado) Secretaria da Saúde. Código Sanitário. **Decreto nº12.342 de 27 de setembro de 1978: regulamento da promoção da saúde no campo da competência da Secretaria do Estado da Saúde** (revisado e atualizado até dezembro de 1990). 5. ed. São Paulo: IMESP, 1992. 60 p.

SANTO, E. **Detecção de *Escherichia coli* patogênica extra intestinal e análise de seus fatores de virulência e perfil de resistência antimicrobiana em carne moída de açougues do município de Taquaritinga, SP, Brasil**. 2006. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agropecuária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, São Paulo, SP, 2006.

SANTOS, F. A. N; LEÔNICIO, G. G; SILVA, S. D. F; PINHEIRO, N. F. M; PEREIRA, M. D; LOPES, S. I. **Presença de *Staphylococcus aureus* em carne moída bovina comercializada em feiras e mercados públicos da cidade de São Luís-MA**. 64ª reunião Anual da SBPC. UFMA, 2012.

SILVA C. A., SOUZA E. L., SOUZA C. P. Estudo da qualidade sanitária da carne moída comercializada na cidade de João Pessoa, PB. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, n.121, p. 90-94, 2004.

SILVA, W. P., GANDRA E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo, v.18, n.122, 2001.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema SimPlate**. 2002. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

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

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**, Mossoró, v.6, n.2, p.124-130, 2012.

SOUSA, C. L.; NEVES, E. C. A.; LOURENÇO, L. F. H.; COSTA, E. B.; MONTEIRO, R. R. C. Microbiological and hygienic-sanitary conditions diagnostic in light frozen food industry in Belém/PA. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.3, p. 375-381, 2009.

STEVENS, A., KEROUANTON, A., MARAUT, M., MILLEMANN, Y., BRISABOIS, A., CAVIN, J.F. DUFOUR, B. 2008. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed – field electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. **International Journal Food Microbiology**. v.123, n.3, p. 191-197, 2008.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Seleção dos oligonucleotídeos utilizados no estudo, com uso do BLAST <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>

OBSERVAÇÃO: os oligonucleotídeos estão destacados em amarelo, e as sequências amplificadas em vermelho.

Staphylococcus aureus strain OS-MRSA-4666 FemA (femA) gene, complete cds

GenBank: GQ284642.1

LOCUS: GQ284642 1263 bp DNA linear BCT 24-MAR-2010

DEFINITION: *Staphylococcus aureus* strain OS-MRSA-4666 FemA (femA) gene,complete cds.

ACCESSION: GQ284642

VERSION: GQ284642.1 GI:291264205

KEYWORDS SOURCE: *Staphylococcus aureus*

ORGANISM: *Staphylococcus aureus*

Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcus.

AUTHORS: GIANNOULI, S., LABROU, M., KYRITSIS, A., IKONOMIDIS, A., POURNARAS, S., STATHOPOULOS, C. AND TSAKRIS, A.

TITLE: Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates.

JOURNAL: J. Antimicrob. Chemother. 65 (4), 626-633 (2010)

JOURNAL Submitted (18-JUN-2009) Microbiology, School of Medicine, University of Thessaly, Mezourlo, Larissa 41110, Greece

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1263
                        /organism="Staphylococcus aureus"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /strain="OS-MRSA-4666"
                        /db_xref="taxon:1280"
                        /note="clinical isolate"
     gene              1..1263
                        /gene="femA"
     CDS               1..1263
                        /gene="femA"
                        /EC_number="2.3.2.-"
                        /note="aminoacyltransferase; cell wall synthesis"
                        /codon_start=1
                        /transl_table=11
                        /product="FemA"
                        /protein_id="ADD85339.1"
                        /db_xref="GI:291264206"
                        /translation="MKFTNLTAKEFGAFTDSMPYSHFTQTVGHYELKLAEGYETHLVG
IKNNNNEVIAACLTLTAVPVMKVFKYFYSNRGPVIDYENQELVHFFFNELSKYVKKHRC
LYLHIDPYLPYQYLNHDGEITGNAGNDWFFDKMSNLGFEHTGFHKGFDPVLQIRYHSV
LDLKDKTADDIIKNMDGLRKRNTKKVKKNGVKVRYLSEELPIFRSFMEDTSESKAFA
DRDDKFYYNRLKYYKERVLVPLAYINFDEYIKELNEERDILNKDLNKALKDIEKRPEN
KKAHNKRDNLQQQLDANEQKIEEGKRLQEEHGNELPISAGFFFINPFVVVYAGGTSN
AFRHFAGSYAVPWEMINYALNHGIDRFNFYGVSGKFTEDAEDAGVVKFKKGYNAEIIIE
YVGDFFKPIKKPVYAAAYTALKKVKDRIF"
```

ORIGIN

```
1 atgaagttaa caaatatac agctaaagag tttggtgcct ttacagatag catgccatac
61 agtcatttca cgcaaactgt tggccactat gagttaaagc ttgctgaagg ttatgaaaca
121 catttagtgg gaataaaaa caataatac gaggttattg cagcttgctt acttactgct
181 gtacctgtta tgaaagtgtt caagtatitt tattcaaatac gcggtccagt gatcgattat
241 gaaaatcaag aactcgtaca ctttttcttt aatgaattat caaaatatgt taaaaaacat
301 cgttgcttat acctacatat cgatccatat ttaccatatac aatacttgaa tcatgatggc
```

361 gagattacag gtaatgctgg taatgattgg ttctttgata aaatgagtaa cttaggattt
421 gaacatactg gattccataa aggatattgat cctgtgctac aaattcgtta tcaactcagtg
481 ttagatttaa aagataaac agcagatgac atcattaaaa atatggatgg acttagaaaa
541 agaaacacga aaaaagttaa aaagaatggt gttaaagtaa gatatttatac tgaagaagaa
601 ctaccaatth ttagatcatt tatggaagat acgtcagaat caaaagcttt tgctgatcgt
661 gatgacaagt tttattacaa tcgcttaaaa tattacaaag agcgtgtggt agtgccttta
721 gcgtatatca attttgatga atatattaaa gaactaaatg aagagcgtga tattttaaat
781 aaagatttaa ataaagcatt aaaggatatt gaaaaacgtc ctgaaaataa aaaagcacat
841 aacaagcgag ataacttaca acaacaactt gatgcaaag agcaaaagat tgaagaaggt
901 aaacgtcttc aagaagaaca tggaatgaa ttacctatct ctgctggttt cttctttatc
961 aatccatttg aagttgttta ttatgctggt ggtacatcaa atgcattccg tcattttgcc
1021 ggaagttatg cagtgccctg ggaaatgatt aattatgcat taaatcatgg cattgaccgt
1081 ttttaatttct atgggtgtag tggtaaattt acagaagatg ctgaagatgc tgggtgtagtt
1141 aaattcaaaa aaggttacia tgctgaaatt attgaatatg ttggtgactt ttttaaacca
1201 attaaaaaac ctgtttacgc agcatatacc gcacttaaaa aagttaaaga cagaattttt
1261 tag

Primer forward GCAGTGCCCTGGGAAATGA

**Primer reverse ACACCAGCATCTTCAGCATCT → Reverso complementar
AGATGCTGAAGATGCTGGTGT**

***Salmonella enterica* invasion protein (invA) gene, partial cds**

GenBank: U43272.1

LOCUS: SEU43272 1950 bp DNA linear BCT 21-MAR-1997

DEFINITION: *Salmonella enterica* invasion protein (invA) gene, partial cds.

ACCESSION U43272

VERSION U43272.1 GI:1236874

KEYWORDS SOURCE *Salmonella enterica*

ORGANISM *Salmonella enterica*

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
Enterobacteriaceae; Salmonella.

AUTHORS BOYD, E. F., WANG , F. S., WHITTAM, T. S. AND SELANDER, R. K.

TITLE Molecular genetic relationships of the salmonellae

JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 62 (3), 804-808 (1996)

AUTHORS BOYD, E .F., LI, J., OCHMAN, H. AND SELANDER, R. K.

TITLE Comparative genetics of the inv-spa invasion gene complex of
Salmonella enterica

JOURNAL J. Bacteriol. 179 (6), 1985-1991 (1997)

JOURNAL Submitted (13-DEC-1995) E. Fidelma Boyd, OEB, Harvard University,
16 Divinity Ave., Cambridge, MA 02138, USA

```
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..1950
                        /organism="Salmonella enterica"
                        /mol_type="genomic DNA"
                        /strain="RKS1518"
                        /sub_species="I"
                        /db_xref="taxon:28901"
                        /map="59 Min"
                        /note="serovar Dublin"
     gene              1..1950
                        /gene="invA"
     CDS                <1..>1950
                        /gene="invA"
                        /note="InvA; membrane spanning protein"
                        /codon_start=1
                        /transl_table=11
                        /product="invasion protein"
                        /protein_id="AAC45056.1"
                        /db_xref="GI:1236875"
                        /translation="NSARLRPELLLILVLMVMIISMFVIPLPTYLVDFLIALNIVLAIL
```

VFMGSFYIDRILSFSTFPVALLITLFRLLALSISTSRLLIEADAGEIIATFGQFVIG
 DSLAVGFVVSIVTVVQFIVITKGSERVAEVAARFSLDGMPGKQMSIDADLKAGIIDA
 DAARERRSVLERESQLYGSFDGAMKF IKGDAIAGIIIFVNF IGGISVGMARHGMDLS
 SALSTYTMLTIGDGLVAQIPALLIAISAGFIVTRVNGSDSNMGRNIMTQLLNPFVLY
 VTAILTISMGTLPGFPLPVFVILSVVLSVLFYKFKREAKRSAAKPKTSKGEQPLSIEE
 KEGSSLGLIGDLDKVESTETVPLILLVPKSRREDLEKAQLAERLRSQFFIDYGVRLPEV
 LLRDGEGLDDNSIVLLINEIRVEQFTVYFDLMRVVNYSDVVSVFNGINPTIHHQQSSQY
 FWVTHEEGEKLRELGYVLRNALDELYHCLAVTVARNVNEYFGIQETKHMLDQLEAKFP
 DLLKEVLRHATVQRRISEVLQRLLSERVSVRNMKLIMEALALWAPREKDVINLVEHIRG
 AMARYICHKFANGGELRAVMVSAEVEDVIRKGIQTSGSTFLSLDPEASANLMDLITL
 KLDDLLIAHKDLVLLTSVDVRRFIKK "

ORIGIN

```

1 aacagtgctc gtttacgacc tgaattactg attctggtac taatggtgat gatcatttct
61 atgttcgta ttccattacc tacctatctg gttgatttcc tgatcgcaact gaatatcgta
121 ctggcgatat tgggtgtttat ggggtcgttc tacattgaca gaatcctcag tttttcaacg
181 tttcctgcgg tactgttaat taccacgctc tttcgtctgg cattatcgat cagtaccagc
241 cgtcttatct tgattgaagc cgatgccggt gaaattatcg ccacgttcgg gcaattcgtt
301 attggcgata gcctggcggg gggttttggt gtcttctcta ttgtcaccgt ggtccagttt
361 atcgttatta ccaaagggtc agaacgcgtc gcggaagtcg cggcccgatt ttctctggat
421 ggtatgcccg gtaaacagat gagtattgat gccgatttga aggccggtat tattgatgcg
481 gatgctgcbc gcgaacggcg aagcgtactg gaaagggaaa gccagcttta cggttccttt
541 gacggtgcga tgaagtttat caaaggtagc gctattgccg gcatcattat tatctttgtg
601 aactttattg gcggtatttc ggtggggatg gcccgccatg gtagggattt gtctcctcgt
661 ctgtctactt ataccatgct gaccattggt gatggtcttg tcgcccagat ccccgattg
721 ttgattgcga ttagtgcggg ttttatcgtg actcgcgtaa atggcgatag cgataatatg
781 gggcggaata tcatgacgca gctggtgaa aaccatttg tattggttg tactggctatt
841 ttgaccattt caatgggaac tctgccggga ttcccgtgc cggattttgt tattttatcg
901 gtggttttaa gcgtactctt ctattttaaa ttccgtgaag caaacgtag cgccgcaaaa
961 cctaaaacca gcaaaggcga gcagccgctt agtattgagg aaaaagaagg gtcgctcgtg
1021 ggactgattg gcgatctcga taaagtctct acagagaccg taccgttgat attacttggtg
1081 ccgaagagcc ggcgtgaaga tctggaaaaa gctcaacttg cggagcgtct acgtagtcag
1141 ttctttattg attatggcgt gcgcctgccg gaagtattgt tacgcgatgg cgagggcctg
1201 gacgataaca gcatcgtatt gttgattaat gagatccgtg ttgaacaatt tacggcttat
1261 tttgatttga tgcgagtggt aaattattcc gatgaagtcg tgtcctttgg tattaatcca

```

(sequência foi cortada)

Primer foward TGGATTTGTCCTCCGCTCTG

Primer reverse CGTCATGATATTCCGCCCA -> Reverso complementar

TGGGGCGGAATATCATGACG