

Vanessa Tizott Knaut Scremin
(Organizadora)



Tópicos em **Nutrição**
e **Tecnologia de Alimentos**



Atena
Editora
Ano 2019

Vanessa Tizott Knaut Scremin
(Organizadora)

Tópicos em Nutrição e Tecnologia de Alimentos

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Lorena Prestes e Geraldo Alves

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

T673 Tópicos em nutrição e tecnologia de alimentos / Organizadora
Vanessa Tizott Knaut Scremin. – Ponta Grossa (PR): Atena
Editora, 2019.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-171-8

DOI 10.22533/at.ed.718191203

1. Nutrição. 2. Tecnologia de alimentos. I. Scremin, Vanessa
Tizott Knaut.

CDD 613.2

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de
responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos
autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Nas últimas décadas, o nosso país tem passado por intensas mudanças sociais, econômicas e políticas, resultando em um novo padrão demográfico, epidemiológico e nutricional da população. Estas transformações determinaram um novo perfil nutricional da população brasileira, marcado pela redução dos casos de desnutrição e a permanência das carências nutricionais, como deficiências de ferro e vitamina A, associados ao crescente aumento do sobrepeso e obesidade e as doenças associadas a este novo perfil, as doenças crônicas não transmissíveis.

Estas mudanças também repercutiram na mudança de padrões de produção e consumo de alimentos, fortalecendo a temática Segurança Alimentar e Nutricional (SAN), que em sua definição inclui a dimensão nutricional, a disponibilidade e a segurança dos alimentos:

Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) é a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras de saúde, que respeitem a diversidade cultural e que sejam social, econômica e ambientalmente sustentáveis. (CONSEA, 2004)

Sendo assim, a SAN está relacionada a fome, a desnutrição, a obesidade, ao sobrepeso, as doenças ligadas à alimentação e à qualidade dos alimentos, ao modelo de produção e consumo de alimentos.

Tendo em vista a importância deste tema e necessidade de reflexões sobre o mesmo, este livro apresenta quatorze artigos relacionados aos diferentes vieses desta temática. Os artigos são resultado de pesquisas realizadas nos mais diversos setores e instituições, com uma riqueza metodológica e de resultados.

Aos pesquisadores, aos editores e aos leitores, a quem se dedica este trabalho, agradeço imensamente a oportunidade de organizá-lo.

Vanessa Tizott Knaut Scremin

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
ANÁLISE NUTRICIONAL DO CARDÁPIO DE PRATOS EXECUTIVOS SEGUNDO O PROGRAMA DE ALIMENTAÇÃO DO TRABALHADOR (PAT)	
Eliane Costa Souza Flávio Eli da Silva Lidiane Míria Bezerra de Alcântara Centro Universitário Cesmac Giane Meyre de Assis Aquilino Centro Universitário Cesmac Fabiana Melo Palmeira Otávyia Barros Vieira	
DOI 10.22533/at.ed.7181912031	
CAPÍTULO 2	8
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FÁRMACOS ANTIDEPRESSIVOS COM OS NUTRIENTES	
Adiene Silva Araújo Faldrecya de Sousa Queiroz Borges	
DOI 10.22533/at.ed.7181912032	
CAPÍTULO 3	13
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NUTRICIONAL E BIOATIVO DE CULTIVARES DE GOIABA PRODUZIDOS NO RIO DE JANEIRO	
Mariana Gonçalves Corrêa Jessica Soldani Couto Anderson Junger Teodoro	
DOI 10.22533/at.ed.7181912034	
CAPÍTULO 4	25
EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE LICOPENO ISOLADO E NA MATRIZ ALIMENTAR SOB MARCADORES DE LESÃO HEPÁTICA DE RATAS ALIMENTADAS COM DIETA HIPERLIPÍDICA	
Monique de Barros Elias Campos Vanessa Azevedo de Jesus Anderson Junger Teodoro Vilma Blondet de Azeredo	
DOI 10.22533/at.ed.7181912035	
CAPÍTULO 5	40
ENCAPSULAÇÃO DE VITAMINA D PARA APLICAÇÃO EM ALIMENTOS	
Ana Paula Zapelini de Melo Cleonice Gonçalves da Rosa Michael Ramos Nunes Carolina Montanheiro Noronha Pedro Luiz Manique Barreto	
DOI 10.22533/at.ed.7181912036	

CAPÍTULO 6 56

ENTEROCOCCUS SPP. EM SUPERFÍCIE DE VEGETAIS: FREQUENCIA DE ISOLAMENTO E RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Silvia Helena Tormen
Luciana Furlaneto Mais
Márcia Regina Terra
Natara Favari Tosoni
Márcia Cristina Furlaneto

DOI 10.22533/at.ed.7181912037

CAPÍTULO 7 68

FARINHA DE SEMENTE DE MAMA-CADELA: APLICABILIDADE TECNOLÓGICA PARA PRODUÇÃO DE PÃO DE MEL

Vânia Maria Alves
Danilo José Machado de Abreu
Katiúcia Alves Amorim
Edson Pablo da Silva
Clarissa Damiani

DOI 10.22533/at.ed.7181912038

CAPÍTULO 8 76

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE GELEIAS COMERCIAIS DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*)

Luzimary de Jesus Ferreira Godinho Rocha
Valdênia Cristina Mendes Mendonça
Rachel Fernandes Torquato
Francisco José da Conceição Lima
Ocilene Maria Correia Ferreira
Javier Telis-Romero
José Francisco Lopes Filho

DOI 10.22533/at.ed.7181912039

CAPÍTULO 9 82

LEVEDURA RESIDUAL CERVEJEIRA: CARACTERÍSTICAS E POTENCIAIS APLICAÇÕES

Darlene Cavalheiro
Angélica Patrícia Bertolo
Aniela Pinto Kempka
Luciana Alberti
Mirieli Valduga
Marana Sandini Borges
Ana Paula Biz
Elisandra Rigo

DOI 10.22533/at.ed.71819120310

CAPÍTULO 10 89

MORTADELA TIPO BOLOGNA ADICIONADA DE FARINHA DE SEMENTE DE ABÓBORA (*CUCURBITA MAXIMA*) COMO ANTIOXIDANTE NATURAL

Marcia Alves Chaves
Denise Pastore de Lima
Cristiane Canan
Letícia Kirienco Dondossola
Keila Tissiane Antonio

DOI 10.22533/at.ed.71819120311

CAPÍTULO 11	99
PESQUISA DE COLIFORMES A 45°C EM QUEIJO TIPO RICOTA COMERCIALIZADOS EM SUPERMERCADOS	
Izabelle Giordana Braga Oliveira Costa Eliane Costa Souza	
DOI 10.22533/at.ed.71819120312	
CAPÍTULO 12	105
RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS NOS ALIMENTOS VEGETAIS: AÇÕES DO ESTADO DE SANTA CATARINA NA MITIGAÇÃO, MONITORAMENTO E RASTREABILIDADE	
Diego Medeiros Gindri Paulo Tarcísio Domatos de Borba Roberta Duarte Ávila Vieira Matheus Mazon Fraga Ricardo Miotto Ternus Greícia Malheiros da Rosa Souza Nelson Alex Lorenz	
DOI 10.22533/at.ed.71819120313	
CAPÍTULO 13	117
RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS DE USO VETERINÁRIO EM SOPINHAS DESTINADAS A LACTENTES E CRIANÇAS DE PRIMEIRA INFÂNCIA	
Rosana Gomes Ferreira Jônatas Vieira Grutes Mararlene Ulberg Pereira Mychelle Alves Monteiro Felipe Stanislau Candido Bernardete Ferraz Spisso	
DOI 10.22533/at.ed.71819120314	
SOBRE A ORGANIZADORA	122

Enterococcus SPP. EM SUPERFÍCIE DE VEGETAIS: FREQUENCIA DE ISOLAMENTO E RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS

Silvia Helena Tormen
Luciana Furlaneto Mais
Márcia Regina Terra
Natara Favari Tosoni
Márcia Cristina Furlaneto

RESUMO: Enterococos pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL) e podem ser isolados de plantas, solo, água, alimentos e do trato digestório de humanos e outros mamíferos. Alguns isolados são potencialmente patogênicos, com capacidade de formação de biofilme e resistência a antimicrobianos, principalmente à vancomicina e demais antimicrobianos clinicamente importantes. Devido a este cenário, alimentos estão sendo sugeridos como reservatórios de enterococos resistentes a antimicrobianos. Contudo, são escassos os estudos que analisam a presença deste microrganismo em vegetais. Portanto, este estudo teve como objetivo isolar e identificar *Enterococcus* spp a partir de amostras vegetais folhosos, legumes e raízes, e verificar sua suscetibilidade a antimicrobianos. Os isolados foram identificados ao nível de gênero/espécie pela reação da polimerase em cadeia (PCR). A sensibilidade a antimicrobianos foi determinada pelo método de disco-difusão e foram obtidos 85 isolados de *Enterococcus* distribuídos em 62% das amostras analisadas. As espécies

identificadas foram: *Enterococcus casseliflavus/flavescens*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus avium*. Apresentaram resistência fenotípica a todos os antimicrobianos testados 64% dos isolados, principalmente à vancomicina, eritromicina, teicoplanina, ampicilina e penicilina. A maioria das espécies apresentou pelo menos um isolado resistente à vancomicina. A multirresistência foi detectada em 65% dos isolados resistentes. De acordo com estes resultados, os vegetais podem atuar como reservatório de enterococos resistentes a diversos antimicrobianos de importância clínica, principalmente à vancomicina. Isso representa um risco para a saúde pública uma vez que a vancomicina é o último recurso terapêutico para o tratamento de infecções enterocócicas graves.

PALAVRAS-CHAVE: Alimentos. Vancomicina. Biofilme.

ABSTRACT: Enterococci belong to the group of lactic acid bacteria (BAL) and can be isolated from plants, soil, water, food and from the digestive tract of humans and other mammals. Some isolates are potentially pathogenic, with biofilm formation and antimicrobial resistance, mainly to vancomycin and other clinically important antimicrobials. Because of this scenario, foods are being suggested as

reservoirs of antimicrobial resistant enterococci. However, there are few studies that analyze the presence of this microorganism in vegetables. Therefore, this study aimed to isolate and identify *Enterococcus* spp from leafy vegetable samples, vegetables and roots, and verify its susceptibility to antimicrobials. Isolates were identified at the genus / species level by polymerase chain reaction (PCR). Antimicrobial susceptibility was determined by the disc-diffusion method and 85 *Enterococcus* isolates were obtained in 62% of the samples analyzed. The species identified were: *Enterococcus casseliflavus* / *flavescens*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus mundtii* and *Enterococcus avium*. Phenotypic resistance to all antimicrobials tested showed 64% of the isolates, mainly vancomycin, erythromycin, teicoplanin, ampicillin and penicillin. Most species had at least one vancomycin-resistant isolate. Multidrug resistance was detected in 65% of resistant isolates. According to these results, the plants can act as reservoirs of enterococci resistant to several antimicrobials of clinical importance, mainly vancomycin. This represents a risk to public health since vancomycin is the last therapeutic resource for the treatment of severe enterococcal infections.

KEYWORDS: Food. Vancomycin. Biofilm.

1 | INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Enterococcus* são capazes de sobreviver a uma série de condições hostis, na qual permite sua ampla distribuição na natureza, sendo comensais do trato digestório de mamíferos e aves (FISCHER; PHILLIPS, 2009; HIDANO et al., 2015). Apesar de ter aplicações úteis em alimentos, a entidade Europeia de Segurança de Alimentos, *European Food Safety Authority-EFSA* (2013), não considera isolados de enterococos seguros para uso como aditivo alimentar. A insegurança é atribuída ao fato de que essas bactérias são apontadas como responsáveis por graves infecções hospitalares (FOULQUIE-MORENO et al., 2006; EFSA, 2013). Essa patogenicidade, ocorre porque os enterococos possuem a capacidade de adquirir resistência à diversos antimicrobianos, incluindo vancomicina, que é a última opção terapêutica para tratar infecções enterocócicas graves (TALEBI et al., 2015).

Em consequência da elevada resistência e capacidade de multiplicação dos enterococos nos alimentos, estes estão presentes em carnes e produtos cárneos, leite e derivados, vegetais e derivados (KOLUMAN; AKANB; ÇAKIROGLU, 2009; CAMARGO et al., 2014; PESAVENTO et al., 2014). A frequência de isolamento varia dependendo do tipo de alimento, das condições de processamento e da sazonalidade (CAMARGO et al., 2014). Estudos mostram que os alimentos de origem animal são mais contaminados por enterococos que alimentos de origem vegetal (MCGOWAN et al., 2006; CAMARGO et al., 2014).

Frutas e vegetais são alimentos essenciais em uma dieta alimentar saudável. Por essa razão há um estímulo para o consumo e uma maior procura por esses produtos (CAMPOS et al., 2013). Porém estes são consumidos crus, submetidos a tratamentos

térmicos brandos ou somente sanitizados tornando-os potenciais veiculadores de microrganismos patogênicos (SCHWAIGER et al., 2011).

Alguns trabalhos tem relatado a presença de enterococos em diversos vegetais (Tabela 1). Contudo, ainda é escasso o estudo do perfil de resistência dessas bactérias veiculadas por vegetais.

ALIMENTO	BACTÉRIA	LOCALIZAÇÃO	REFERENCIA
legumes, vegetais amiláceos, legumes minimamente processados, cogumelos, azeitonas e ervas frescas	<i>E. casseliflavus</i>		Gomes et al. (2008),
vegetais folhosos, cenoura, mistura de folhosos e cenoura e na mistura folhosos, cenoura e milho	<i>E. casseliflavus</i>	Portugal	Campos et al. (2013)
tomates e rabanetes	<i>E. casseliflavus</i>	EUA	McGowan et al. (2006) e Micallef et al. (2013)
cenoura, espinafre e pepino	<i>E. casseliflavus</i>	Japão	Izumi, et al. (2004)
cereja, pimentão verde, azeitona preta	<i>E. casseliflavus</i>	Espanha	Abriouel et al. (2008)
guacamole e farinha integral de trigo vermelho	<i>E. casseliflavus</i>	Espanha	Fernandez-Fuentes et al., 2012
beterraba, batata e salsa	<i>E. faecium</i>	Brasil	Riboldi et al., 2009
azeitonas fermentadas verdes e pretas, beterraba, alcachofra, broto de alfafa, brócolis, endívias, morango, alface, cereja, batata, produtos a base de soja e tomate	<i>E. faecium</i>	Espanha	Pesavento et al., 2014
saladas, cereais, legumes, raízes, vegetais bulbosos, e frutas (tomate, pimenta, abobrinha e pepino)	<i>E. faecalis</i>	Alemanha	Schwaiger et al., 2011
tomate orgânico	<i>E. durans</i>	Espanha	Fernandez-Fuentes et al., 2012
saladas prontas para consumo	<i>E. durans</i>	Itália	Pesavento et al., 2014
saladas prontas para consumo	<i>E. gallinarum</i>	Portugal e Itália	Campos et al., 2013; Pesavento et al., 2014
saladas prontas para consumo	<i>E. hirae</i>	Portugal	Campos et al., 2013
vegetais diversos	<i>E. hirae</i>	Tunísia	Said et al., 2015
alface	<i>E. haemoperoxidus</i>	Brasil	Camargo et al., 2014
vegetais diversos	<i>E. collumbae/raffinosus</i>	Brasil	Camargo et al., 2014
cereja	<i>E. mundtii</i>	Espanha	Abriouel et al., 2008
tomates	<i>E. avium</i>	EUA	Micallef et al., 2013

Tabela 1 – Isolamento de espécies do gênero *Enterococcus* em amostras vegetais e países envolvidos nos estudos

O aumento do número de isolados resistentes a antibióticos pode ser devido a pressão seletiva, em parte causada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na agricultura e na clínica humana (CHANG et al., 2015). A resistência dos enterococos a antimicrobianos se deve, em parte, a eficientes mecanismos de transferência de genes de resistência interespecies e gêneros (FISCHER; PHILLIPS, 2009; HIDANO et al., 2015).

E. faecium e *E. faecalis* resistentes a antimicrobianos tem sido a principal causa de endocardite e infecções urinárias em pacientes imunocomprometidos, idosos ou com comorbidades internados em hospitais (MALANY et al., 2002). Como consequência da resistência desse microrganismo a antimicrobianos, ocorre o aumento do tempo de internação, que tem um grande impacto negativo sobre os custos hospitalares, além de exigir esquemas terapêuticos adicionais (WENZEL; EDMOND, 2001).

Pelo fato de enterococos resistentes à antimicrobianos, poderem ser encontrados em alimentos, e pela possibilidade desses colonizarem o trato digestório humano, sustentaria a hipótese de que os alimentos poderiam ser um dos veículos de contaminação (MICALLEF, et al., 2011). No Brasil, há poucos estudos envolvendo uma possível contribuição dos alimentos de origem vegetal como reservatórios de enterococos resistentes a antimicrobianos. Dessa forma, este estudo se propôs ampliar o conhecimento sobre a presença deste gênero, em alimentos de origem vegetal, quanto a sua característica de sensibilidade a antimicrobianos.

2 | FUNDAMENTAÇÃO METODOLÓGICA

2.1 Amostragem, Preparo Da Amostra, Isolamento E Identificação Fenotípica De *Enterococcus* sp

Sessenta e seis amostras de vegetais folhosos, legumes e tubérculos, *in natura* e minimamente processados foram adquiridos de supermercados, feiras-livres e direto do produtor em cidades das regiões Centro-sul e Norte do Paraná. Posteriormente, 25 g de cada produto foi pesado assepticamente e transferido para 225 mL de água peptonada 1% (m/v). O frasco foi agitado vigorosamente por 30 segundos quando a amostra era proveniente de vegetais folhosos e por 2 min para os demais vegetais. Foi aguardada a decantação da amostra para o procedimento das diluições seriadas.

A partir das diluições seriadas das amostras, uma alíquota de 100 μ L foi depositada e espalhada por *spread plate* em Ágar KEA (Isofar). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Ethiktechnology, 410 SNDRE) a 37°C por 24 h. Colônias de coloração negra, características de enterococos, foram contadas e três delas foram inoculadas em ágar BHI (Himedia) seguida de incubação a 37°C por 24 h.

Paralelamente, a diluição 10^{-1} foi incubada a 37°C por 18 h. Não havendo colônias típicas no ágar KEA, previamente incubados, uma alíquota desta solução foi semeada

por esgotamento em superfície de KEA e em Ágar M17, incubadas a 37°C por 24 h. Um total de três colônias típicas de ambos os meios foram isoladas, conforme descrito acima.

As colônias provenientes do crescimento em ágar BHI foram submetidas aos testes fenotípicos: reação morfotintorial, teste de catalase e crescimento em meio hipersalínico em diferentes temperaturas.

A reação morfotintorial seguiu o protocolo da coloração de Gram (New Prov), com auxílio do microscópio óptico (Olympus, CX21FS1). Os isolados que se apresentaram como cocos Gram-positivos, aos pares, isolados ou em pequenas cadeias foram submetidos ao teste de atividade da enzima catalase. Para tanto, foi depositada uma suspensão bacteriana sobre lâmina de vidro e acrescentada uma gota de peróxido de hidrogênio 3% (v/v). Isolados sem formação de bolhas, indicativo de reação negativa, foram submetidos a teste de crescimento em caldo BHI acrescido de 6,5% (m/v) de cloreto de sódio, incubados a 10°C e a 45°C por 24 h (FACKLAM et al., 1999). Tubos que apresentaram turvação foram considerados positivos para crescimento.

2.2 Extração De Dna E Identificação Genotípica Gênero-Espécie

A extração de DNA genômico foi feita pelo método de fervura. Os isolados foram cultivados em 3 mL de meio BHI, e incubados a 37°C sob agitação constante (120 rpm) por 18 h. Após este período, foram centrifugados por 10 min a 10.000 rpm, e o *pellet* foi resuspendido em 500 µL de água ultrapura estéril. Esta suspensão foi submetida ao aquecimento, em temperatura de 90 a 100°C, por 30 min. Em seguida, foi resfriada em banho de gelo e feita novamente centrifugação, nas mesmas condições citadas acima. Por fim, foi retirado 150 µL do sobrenadante contendo DNA total e armazenado em freezer a -20°C. A pureza do DNA e quantificação foi realizada em gel de agarose 0,8%.

Os isolados de *Enterococcus* spp. foram identificados ao nível de gênero/espécie pela PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 2.

Gênero/Espécie	Tamanho do produto amplificado	Oligonucleotídeos iniciadores Sequência (5'-3')	Fonte
<i>Enterococcus</i> <i>spp.</i>	122	TACTGACAAACCATTCATGAG ACTTCGTCACCAACGCGAAC	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
<i>E. avium</i>	368	GCTGCGATTGAAAAATATCCG AAGCCAATGATCGGTGTTTTT	Silva, et al. (2012)
<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavencens</i>	439	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
<i>E. columbae</i>	284	GAATTTGGTACCAAGACAGTT GCTAATTTACCGTTATCGACT	Silva, et al. (2012)
<i>E. faecalis</i>	941	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)

<i>E. faecium</i>	550	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
<i>E. gallinarum</i>	822	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
<i>E. hirae</i>	186	TAAATTCTTCCTTAAATGTTG CTTTCTGATATGGATGCTGT	Jackson; Fedorka-Cray; Barrett (2004)
<i>E. mundtii</i>	301	CAGACATGGATGCTATTCCATCT AGGTTTTCTTGCCCTTCCATCAAT	Jackson; Fedorka-Cray; Barrett (2004)
<i>E. seriolicida</i>	100	ACACAATGTTCTGGGAATGGC AAGTCGTCAAATGAACCAAAA	Silva, et al. (2012)
<i>E. solitarius</i>	371	AAACACCATAACACTTATGTGACG AATGGAGAATCTTGGTTTGGCGTC	Silva, et al. (2012)

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores genero/espécie-específico utilizados para identificação de *Enterococcus* spp.

A amplificação do DNA extraído de cada isolado foi realizada em termociclador (Techne-TC3000), em um volume final de 20 µL, contendo 10 ng de DNA, 1,0 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10X Tampão da Taq, 2,5 mM de MgCl₂, 0,17 mM de cada desoxidonucleotídeo trifosfato (dNTP), 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. O termociclador foi programado para operar nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C por 2 min, seguido por 30 ciclos de 94°C à 1 min, anelamento na temperatura de 50 a 55 °C, por 1 min, extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1,0 % (m/v). Após a corrida, os géis foram corados com solução de brometo de etídio 0,005% (m/v) durante 15 min, visualizados em transiluminador ultravioleta e fotodocumentados com sistema computadorizado (Loccus). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de peso molecular Lambda DNA ladder de 1Kb plus (Amersham Pharmacia Biotech).

2.3 Teste De Suscetibilidade A Antimicrobianos

Os padrões de suscetibilidade a antimicrobianos foram determinados pelo método disco-difusão, de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2011). Os ensaios foram realizados a partir de cultivos dos isolados confirmados como *Enterococcus* sp pela PCR, em caldo BHI, obtidos após incubação a 37°C por 24 h. Posteriormente, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% (m/v), com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente 1 x 10⁸ UFC/mL). As suspensões foram semeadas sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton – MHA (Himedia). Sobre a superfície dos meios inoculados foram depositados discos de papel impregnados com os seguintes antimicrobianos: Ampicilina-AMP (10µg), Ciprofloxacina-CIP (5 µg), Cloranfenicol-CLO (30 µg), Eritromicina-ERI (15 µg), Imipenem-IMP (10

µg), Norfloxacin-NOR (10 µg), Penicilina-PEN (10 µg), Tetraciclina-TET (30 µg), Teicoplanina- TEC (30 µg) e Vancomicina-VAN (30 µg) (Laborclin). As placas foram incubadas por 18-24 h a 37°C, sendo que os halos de inibição foram mensurados e posteriormente interpretados segundo a tabela de sensibilidade a antimicrobianos. Para o controle de qualidade foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4 Distribuição Das Espécies De *Enterococcus* Spp. Em Vegetais

Foram processadas 66 amostras de 21 diferentes espécies de vegetais, sendo constituídas de: abobrinha, acelga, agrião hidropônico, alface, almeirão, brócolis, broto de bambu, broto de feijão, cenoura, cheiro-verde, couve-flor, couve manteiga fatiada, couve manteiga em maço, mandioca descascada, milho verde, pepino, pimentão verde, pimentão vermelho, rúcula de plantio comum, rúcula hidropônica, repolho, tomate e vagem. A partir destas amostras, foram selecionados aleatoriamente 202 isolados bacterianos com características presuntivas nos ágaros KEA e M17. Destes, 85 isolados foram confirmados para o gênero *Enterococcus*, pela técnica da PCR. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por Campos *et al.* (2013) e Camargo *et al.* (2014) que detectaram enterococos em 70% e 73,3% de enterococos em amostras de vegetais, respectivamente.

Contudo, estudos apontam que alimentos de origem vegetal são menos contaminados por enterococos em comparação aos de origem animal (GOMES, *et al.*, 2008; PESAVENTO *et al.*, 2014). Alguns autores relataram contaminação por enterococos em 100% de amostras de queijo (FURLANETO-MAIA *et al.*, 2014) e amostras de queijo e aves de criação (CAMARGO *et al.* 2004). No entanto, a frequência detectada nos resultados apresentados neste trabalho é elevada, ao ponto de servir de alerta, uma vez que esse microrganismo foi apontado como responsável por infecções nosocomiais (FISHER; PHILLIPS, 2009) e por atuar como deteriorante em alimentos (ALCANTARA *et al.*, 2012).

Foram identificadas cinco espécies (Tabela 3), sendo: 19% como *E. casseliflavus/flavescens*, 6% como *E. columbae*, 4% como *E. faecium*, 4% como *E. mundtii*, 2% como *E. avium* e 84% como *Enterococcus* sp. Onze diferentes espécies de vegetais apresentaram duas espécies diferentes na mesma amostra. Ao observar a distribuição das espécies de acordo com os tipos de vegetais, a maior diversidade de espécies foi encontrada em vegetais folhosos e legumes, sendo detectadas 4 diferentes espécies, porém a diferença foi pequena comparada com o grupo das raízes onde foram encontradas 3 espécies diferentes.

Tipo de vegetal	Quantidade de amostras	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. avium</i>
Abobrinha	6	7	1			1	
Acelga	1	2	1				
Agrião hidropônico	3	4					
Alface	7	4	2				
Almeirão	3	3					
Brócolis	5	2		2			
Broto de bambu	1	1					
Broto de feijão	1	-					
Cenoura	4	2					
Cheiro-verde	6	2	3				2
Couve-flor	1	2					
Couve manteiga maço	2	1	1				
Couve manteiga fatiada	3	1	1				
Mandioca descascada	5	5			2		
Milho verde	3	2	2		1		
Pepino	1	-					
Pimentão verde	2	4					
Pimentão vermelho	1	4					
Rúcula comum	1	2				1	
Rúcula hidropônica	6	5	5			1	
Repolho	1			2			
Tomate	3	3		1			
Vagem	1	-					
Total de isolados por espécie		56	16	5	3	3	2

Tabela 3 - Espécies de *Enterococcus* sp. em alimentos de origem vegetal.

3.5 Suscetibilidade Fenotípica A Antimicrobianos

Com a finalidade de aprofundar o conhecimento sobre o perfil de resistência a antimicrobianos, todos os isolados confirmados como *Enterococcus* foram submetidos ao antibiograma. Um total de 64% (54/85) dos isolados apresentaram resistência fenotípica aos antimicrobianos testados neste estudo, a maioria destes clinicamente relevantes. Destes, 58% (30/54) foram provenientes de vegetais folhosos, 33% (19/54)

de legumes e 9% (5/54) de raízes. Todos os grupos de vegetais testados apresentaram uma alta incidência de isolados resistentes, com 70% (30/43) dos isolados de folhosos, 58% (19/33) dos legumes e 56% (5/9) das raízes (Tabela 4). Cabe ressaltar ainda, que os isolados provenientes de vegetais folhosos apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados, enquanto que os provenientes de legumes foram sensíveis apenas ao cloranfenicol e os isolados de raízes foram sensíveis ao cloranfenicol, imipenem, penicilina e a tetraciclina.

Tipo de vegetal	Porcentagem de isolados resistentes	Resistência	Sensibilidade
Folhosos	70%	AMP, CIP, CLO, ERI, IPM, NOR, PEN, TEC, TET, VAN	
Legumes	58%	AMP, CIP, ERI, IPM, NOR, PEN, TEC, TET, VAN	CLO
Raízes	56%	AMP, CIP, ERI, NOR, TEC, VAN	CLO, IPM, PEN, TET

Tabela 4 - Suscetibilidade a antimicrobianos apresentada por enterococos, provenientes de diferentes tipos de vegetais, pelo método disco-difusão.

AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ERI: eritromicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacina, PEN: penicilina, TEC: teicoplanina; VAN: vancomicina.

Conforme pode ser observado no Gráfico 1, os isolados apresentaram resistência aos antimicrobianos testados. sendo que alguns isolados apresentaram-se como multirresistentes (tabela 6).

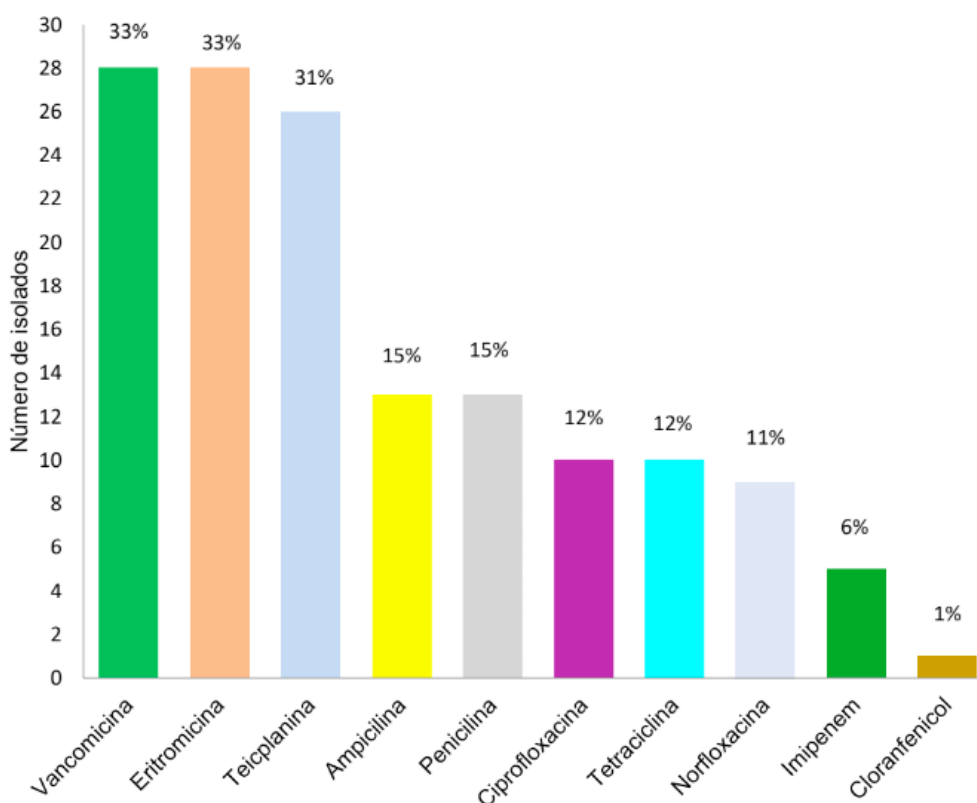


Gráfico 1 - Perfil de resistência fenotípico de enterococos, provenientes de vegetais, contra antimicrobianos testados pelo método disco-difusão.

	CIP	NOR	CLO	ERI	AMP	IMP	PEN	TET	TEC	VAN
<i>E. casseliflavus/flavescens</i>	4	2	1	3	2		2		1	1
<i>E. columbae</i>	1	1		1				3	1	1
<i>E. faecium</i>	2	1								
<i>E. mundtii</i>				3					2	2
<i>E. avium</i>				2	2				2	2

Tabela 5 - Número de isolados resistentes aos antimicrobianos testados pelo método disco-difusão, de acordo com as espécies de *Enterococcus* spp., identificadas a partir de vegetais.

AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ERI: eritromicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacin, PEN: penicilina, TEC: teicoplanina; VAN: vancomicina.

A presença de enterococos em alimentos de origem vegetal e o fato de muitos deles serem consumidos crus ou minimamente processados, aumenta a preocupação de que isolados patogênicos possam contribuir para a disseminação de resistência e fatores de virulência para a flora intestinal humana, bem como, no ambiente clínico (ABRIOUEL et al., 2008).

Apesar das evidências mostrando a contribuição do uso dos antimicrobianos na agricultura para o aparecimento e disseminação da resistência nos alimentos, este não deve ser o único motivo, uma vez que as razões são complexas e multifatoriais, requerendo mais investigação (GOUSIA et al., 2011).

CONCLUSÕES

Neste estudo foi detectada a presença de *E. casseliflavus/flavescens*, *E. columbae*, *E. faecium*, *E. mundtii* e *E. avium* em alimentos de origem vegetal no Paraná, Brasil. A resistência fenotípica foi expressa para todos os antimicrobianos testados, sendo a resistência à vancomicina, eritromicina e teicoplanina mais expressiva. De acordo com estes resultados, alimentos de origem vegetal podem atuar como reservatório de enterococos resistentes a antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; MOLINOS, A.C.; LÓPEZ, R. L.; GRANDE, M. J.; MARTINEZ-VIDEIRA, P.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M.M.; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 38–49, 2008.

ALCÂNTARA, M.; MORAIS, I.C.L.; SOUZA, C.M.O.C.C. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos, Revista **Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 6, p. 1-20, 2012.

CAMARGO, C.H.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; LEE, S.H.; FERNANDES Jr, A.; KANENO, R.; RALL, V.L.M. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 111-115, 2014.

CAMPOS, J.; MOURÃO, J.; PESTANA, N.; PEIXE, L.; NOVAIS, C.; ANTUNES, P. Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes, **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 464–470, 2013.

CHANG, Q.; WANG, W.; REGEV-YOCHAY, G.; LIPSITCH, M.; HANAGE, W.P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?, **Evolutionary Applications**, v.8, p. 240–245, 2015.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement**. CLSI/NCCLS document M100-S21, 2011.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.

EFSA (European Food Safety Authority). **Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2010): FSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)**. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1944.pdf>. Acessado em 11/08/2014.

FERNANDEZ-FUENTES, M.A.; ABRIOUL, H.; MORENTE, E.O.; PULIDO, R.P.; GÁLVEZ, A. Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods, **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 49–56, 2014.

FISCHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749–1757, 2009.

FOUQUIÉ-MORENO, M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1-24, 2006.

FURLANETO-MAIA, L.; ROCHA, K.R.; HENRIQUE, F.C.; GIAZZI, A.; FURLANETO, M.C. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* sp isolated from soft cheese in Southern Brazil, **Advances in Microbiology**, v. 4, p.175-181, 2014.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B.D.G.M.; DE MARTINIS, E.C.P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, 668-675, 2008.

GOUSIA, P.; ECONOMOU, V.; SAKKAS, H.; LEVEIDIOTOU, S.; PAPADOPOLOU, C. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 27-38, 2011.

HIDANO, A. YAMAMOTO, T. HAYAMA, Y. MUROGA, N. KOBAYASHI, S.; NISHIDA, T.; TSUTSUI, T. Unraveling Antimicrobial Resistance Genes and Phenotype Patterns among *Enterococcus faecalis* Isolated from Retail Chicken Products in Japan, **PLOS ONE**, 2015.

IZUMI, H.; NAGANO, M.; OSAKI, Y. Microbial evaluation of fresh marketed vegetables, **Mem. School. B.O.S.T. Kinki University**, v. 13, p. 15-22, 2004.

JACKSON, C.R.; FEDORKA-CRAY, P.J.; BARRET, J.B. Use of genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci, **J. Clin. Microbiol**, v. 42, p. 3558-3565, 2004.

KOLUMAN, A.; AKANB, L.S.; ÇAKIROGLUB, F.P. Occurrence and antimicrobial resistance of Enterococci in retail foods. **Food Control**, v. 20, p. 281, 283, 2009.

MALANI, P.N.; KAUFFMAN, C.A.; ZERVOS, M.J. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E., Rice, L.B. (Eds.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic resistance*. ASM, Washington, D.C., pp. 385–408, 2002.

MCGOWAN, L.; JACKSON, C.R.; BARRET, J.B.; et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats, **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2976-2982, 2006.

MICALLEF, S.A.; GOLDSTEIN, R.E.R.; GEORGE, A.; EWING, L. TALL, B.D.; BOYER, M.S.; JOSEPH, S.W.; SPKOTA, A.R. Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on U.S Mid-Atlantic farms, **Food Microbiology**, v. 36, p. 465-474, 2013.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; DUCCI, B.; MAGNANINI, A.; LO NOSTRO, A. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat, **Food Microbiology**, v. 41, p. 1-7, 2014.

RIBOLDI, G.P.; FRAZZON, J.; AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, A.P.G. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, 125-128, 2009.

SAID, L.B.; KLIBI, N.; DZIRI, R.; BORGIO, F.; BOUDABOUS, A.; SLAMA, K.B.; TORRES, C. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages of *Enterococcus* spp. from vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia, **Science of Food Agriculture**, Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988398>, 2015.

SCHWAIGER, K.; HELMKE, K.; HOLZEL, C.S.; BAUER, J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farms vs. supermarket), **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 191-196, 2011.

SILVA, V.L.; CAÇADOR, N.C.; SILVA, C.S.F.; FONTES, C.O.; GARCIA, G.D.; NICOLI, J.R.; DINIZ, C.G. Occurrence of Multidrug-Resistant and Toxic-Metal Tolerant Enterococci in Fresh Feces from Urban Pigeons in Brazil, **Microbes Environ.**, v. 27, p. 179–185, 2012.

WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B.. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 174–177, 2001.

SOBRE A ORGANIZADORA

Vanessa Tizott Knaut Scremin: Mestre em Ensino de Ciências e Tecnologia, pela UTFPR. Especialista em Nutrição Parenteral e Enteral, pela Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral (BRASPEN). Pós-graduada em Gestão em Saúde, pela UAB/UEPG em 2018, e em Nutrição Clínica, pelo GANEP Nutrição Humana em 2010. Graduada em Nutrição, pelo Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais, em 2008. Atua como nutricionista da Secretaria Estadual de Saúde do Paraná/3ª Regional de Saúde e como docente do curso de graduação em Nutrição, no Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-171-8

