

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MELINA ZUZI FABIANO

**EFEITO DA PRÓPOLIS SOBRE O CRESCIMENTO DE BACILOS
GRAM-NEGATIVOS MÓVEIS COLETADOS EM HORTIFRUTIGRANJEIRO**

SÃO CARLOS

2011

**EFEITO DA PRÓPOLIS SOBRE O CRESCIMENTO DE BACILOS
GRAM-NEGATIVOS MÓVEIS COLETADOS EM HORTIFRUTIGRANJEIRO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

MELINA ZUZI FABIANO

**EFEITO DA PRÓPOLIS SOBRE O CRESCIMENTO DE BACILOS
GRAM-NEGATIVOS MÓVEIS COLETADOS EM HORTIFRUTIGRANJEIRO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, para obtenção do
título de mestre em
Biotecnologia.

Orientação:

*Dr. Rubens Bernardes Filho e
Dra. Lucimara Ap. Forato.*

**SÃO CARLOS
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F118ep Fabiano, Melina Zuzi.
Efeito da própolis sobre o crescimento de bacilos gram-negativos móveis coletados em hortifrutigranjeiro / Melina Zuzi Fabiano. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
75 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Microbiologia. 2. Bactérias gram-negativas. 3. Própolis.
4. Bactérias - controle microbiano. I. Título.

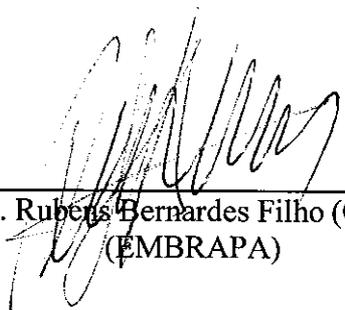
CDD: 576 (20^a)

Melina Zuzi Fabiano

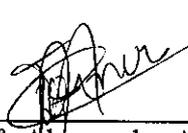
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 27/07/2011

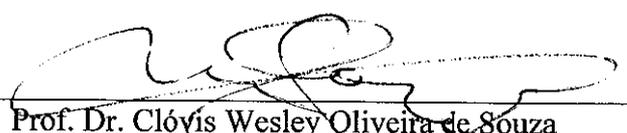
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho (Orientador)
(EMBRAPA)



Prof. Dr.ª Alessandra Alves Corrêa Forner
(UFABC)



Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
(UFSCar)

Dedico este trabalho a DEUS, aos meus pais Valter e Ana Regina, a minha irmã Michele e ao meu namorado Rodrigo que colaboraram e permitiram alcançar mais uma etapa, espero que com este trabalho eu colabore com mais um conhecimento para este mundo de infinitas investigações em busca da Ciência e Tecnologia em prol da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a DEUS pela minha vida.

Agradeço aos meus pais pela Educação, apoio e a oportunidade de estudar.

Agradeço aos meus orientadores Dr. Rubens e Dra Lucimara pela oportunidade, aprendizado, apoio e ajuda no decorrer desta pesquisa.

Agradeço a Embrapa Instrumentação Agropecuária pelo privilégio de desenvolver toda minha pesquisa em sua unidade.

Agradeço a Empresa DNA Consult, especialmente ao Bruno por desenvolver uma etapa da minha pesquisa em seu laboratório.

Agradeço ao meu namorado Rodrigo pela paciência, apoio, compreensão e ajuda.

Agradeço a minha irmã Michele pelo apoio e por assumir a loja do meu pai nas minhas ausências.

Agradeço a minha amiga Tassiane que foi à base, o apoio e o auxílio para a realização desta pesquisa.

Agradeço a Joana e a Silvine pela ajuda, auxílio e dicas fundamentais para facilitar minhas buscas e resultados.

Agradeço as minhas amigas Janaína e Taís que nas horas de folga me ajudaram.

Agradeço a todos os familiares e amigos que fizeram parte de mais uma etapa da minha vida.

RESUMO

Atualmente há uma grande preocupação com a qualidade e a contaminação dos alimentos. Todos os alimentos comercializados “in natura” podem ter algum tipo de contaminação por microrganismos podendo ser ou não patogênicos para os que os consomem. A contaminação pode acontecer em toda cadeia de produção até chegar ao consumidor final. Além do problema sanitário, a contaminação pode contribuir para a diminuição do tempo de prateleira de produtos “in natura”. Um produto que pode atuar nesta cadeia, melhorando a higiene dos alimentos como os hortifrutigranjeiros é a própolis que desde a antiguidade tem sido usada para combater infecções. Conhecida como um antibiótico natural é muito utilizada na medicina veterinária e humana além de indústrias como alimentícia, farmacêutica, cosmética entre outras. A própolis é originada a partir de uma mistura de resinas de plantas, coletada pelas abelhas, sendo que sua ação terapêutica está associada ao seu alto conteúdo de flavonóides. No Brasil, a própolis verde é considerada a de melhor eficiência na ação antibacteriana. Assim, neste trabalho buscou-se caracterizar e identificar a ação da própolis verde, produzida na região Sul do estado de Minas Gerais, sobre bacilos gram-negativos coletados em hortifrutigranjeiro e a partir dos resultados obtidos propor uma possível forma de incorporar os extratos de própolis na cadeia de produção de hortifrutigranjeiros com a finalidade de higienização dos locais onde os alimentos são transportados, armazenados, além da higienização de tais alimentos. Avaliou-se a ação da própolis sobre os bacilos coletados por meio da obtenção de curvas de crescimento na presença de própolis e pelo método de difusão de disco, com o objetivo de se encontrar a mínima concentração de extrato de própolis capaz de inibir ou retardar o crescimento destes bacilos e que não altere o sabor, cheiro e cor dos alimentos onde a própolis fora aplicada.

ABSTRACT

Currently there is great concern about the quality and food contamination. All food marketed "in nature" may have some kind of contamination by microorganisms can be or not pathogenic for those who consume them. The contamination can occur throughout the production chain until it reaches the final consumer. In addition to the health problem, contamination can contribute to reducing the shelf life of products "in nature." A product that can act in this chain, improving the hygiene of foods such is propolis, that since ancient times has been used to battle infections. Known as a natural antibiotic is widely used in veterinary and human medicine as well as industries such as food, pharmaceutical, cosmetics and others. Propolis is derived from a mixture of plant resins, collected by bees, and its therapeutic action is associated with a high content of flavonoids. In Brazil, the green propolis is considered the that hve best antibacterial efficiency. Thus, this study sought to characterize and identify the action of green propolis, produced in the southern state of Minas Gerais, on gram-negative bacilli collected from horticultural and from results obtained propose a possible form of incorporate extracts of propolis in horticultural production chain for the purpose of cleaning the places where food is transported, stored, and the hygiene of such foods. We evaluated the action of propolis on the bacilli collected by obtaining growth curves in the presence of propolis and the disk diffusion method, with the aim of finding the minimum concentration of propolis extract able to inhibit or delay the growth of these bacilli and that do not change the taste, smell and color of food where the propolis was applied.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LB	Luria-Bertani Broth
TSB	Tryptone Soya Broth
TSA	Tryptic Soya Agar
A	Absorbância
mm	Milímetro
UV	Ultravioleta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA 16S	Sequências do RNA ribossômico da subunidade 16S
DNA	Ácido desoxirribonucléico
RNA	Ácido ribonucléico
CO ₂	Gás carbônico
NaCl	Cloreto de sódio
KOH	Hidróxido de potássio
I ₂	Iodo
KI	Iodeto de potássio
pH	Potencial hidrogeniônico
PA	Pró-análise, reagente com alto grau de pureza

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento bacteriano	20
Figura 2. Diferença entre a parede celular das bactérias gram-positivas e gram-negativas.....	21
Figura 3. Estruturas de algumas subclasses dos flavonóides	30
Figura 4. Semeadura por esgotamento em placa: segundo e terceiro conjunto de estrias..	33
Figura 5. Gráfico que representa a quantidade de isolados e suas características.	43
Figura 6. Gráfico de absorvância da solução padrão de quercetina..	51
Figura 7. Exemplos de halos de inibição de alguns isolados em concentrações diferentes de própolis na 1ª extração de própolis	55
Figura 8. Exemplos de halos de inibição de alguns isolados em concentrações diferentes de própolis na 2ª extração de própolis.	56/57
Figura 9. Exemplos de halos de inibição de alguns isolados em concentrações diferentes de álcool.	58
Figura 10. Curva de crescimento do isolado 25.	61
Figura 11. Curva de crescimento do isolado 26	62
Figura 12. Curva de crescimento do isolado 33.	63
Figura 13. Curva de crescimento do isolado 36.	64
Figura 14. Curva de crescimento do isolado 37.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais bactérias presentes nos alimentos.....	24
Tabela 2. Descrição do ciclo de PCR utilizado.....	37
Tabela 3. Microrganismos isolados no hortifrutigranjeiro	42
Tabela 4. Forma e coloração dos isolados do hortifrutigranjeiro	45
Tabela 5. Motilidade dos isolados	47
Tabela 6. Sequência e identificação dos microrganismos.....	48
Tabela 7. Características e identificação dos isolados.....	49
Tabela 8. Quantificação flavonóides 1 ^a extração	52
Tabela 9. Quantificação flavonóides 2 ^a extração	53
Tabela 10. Halo de inibição da 1 ^a extração da própolis.....	54
Tabela 11. Halo de inibição da 2 ^a extração da própolis.....	56
Tabela 12. Halo de inibição do álcool.....	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Ecologia bacteriana.....	18
3.1.1 Morfologia bacteriana.....	21
3.2 Contaminação dos alimentos	23
3.2.1 Exemplos de bacilos gram-negativos mais recorrentes nas infecções alimentares.....	25
3.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	26
3.2.1.2 <i>Salmonella</i>	26
3.2.1.3 <i>Proteus</i>	27
3.2.1.4 <i>Citrobacter</i>	27
3.2.1.5 <i>Vibrio cholerae</i>	28
3.3 A Própolis	28
3.3.1 Própolis alecrim	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Coleta e isolamento bacteriano	32
4.1.1 Isolamento bacteriano	32
4.2 Caracterização dos isolados	33
4.2.1 Coloração de Gram e morfologia celular	33
4.2.2 Teste de motilidade	35
4.3. Identificação dos isolados	36
4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
4.3.2 Análise das sequências.....	37
4.4 Caracterização da própolis.....	38
4.4.1 Obtenção dos extratos	38
4.4.2 Quantificação do teor de flavonóides totais.....	38

4.4.3	Teste de difusão em disco.....	39
4.4.4	Curva de crescimento dos isolados na presença de própolis.....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	Coleta e Isolamento bacteriano.....	41
5.2	Caracterização dos isolados	44
5.2.1	Coloração de Gram e morfologia celular	44
5.2.2	Teste de motilidade	46
5.3	Identificação dos isolados	48
5.4	Caracterização da própolis.....	51
5.4.1	Quantificação teor de flavonóides totais.....	51
5.5	Teste de difusão em disco.....	54
5.6	Curva de crescimento dos isolados na presença de própolis da 2ª extração	60
5.6.1	Curva de crescimento do isolado 25	61
5.6.2	Curva de crescimento do isolado 26	62
5.6.3	Curva de crescimento do isolado 33	63
5.6.4	Curva de crescimento do isolado 36	64
5.6.5	Curva de crescimento do isolado 37	65
6.	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	69
	ANEXOS	74

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores têm se tornado cada vez mais preocupados e exigentes com a qualidade dos produtos que consomem. Estão em busca de produtos cujo processo produtivo seja menos agressivos ao ambiente e de origem natural (PACKER e LUZ, 2007).

Em geral os agro-defensivos ou agrotóxicos são bastante usados na agricultura, são agentes químicos ou biológicos que alteram a composição da flora e da fauna a fim de preservá-la da ação danosa dos fungos, insetos, plantas, bactérias e vírus considerados nocivos. Existem várias categorias dos agro-defensivos como germicidas, fungicidas, herbicidas, formicidas, cupinidas entre outros (DUARTE, 2005).

Para se assegurar a qualidade de uma colheita, faz-se necessário o controle das pragas com o uso de agro-defensivos, no entanto, estas ficam imunizadas progressivamente sendo necessário se utilizar produtos mais potentes e em quantidades cada vez maiores a fim de combatê-las.

Apesar da eficiência dos agro-defensivos eles podem trazer consequências preocupantes como a possível contaminação dos alimentos, danos à saúde dos empregados da lavoura e contaminação da água do lençol freático.

Com isso houve um aumento pela procura por produtos orgânicos¹ e, portanto um incremento na produção de alimentos cultivados sem o uso de agro-defensivos químicos ou outros produtos químicos.

Neste contexto tem-se buscado formas de produção de insumos de origem natural no controle de agentes biológicos nocivos nas frutas e verduras, pois a cada dia vem se tornando um meio eficiente para a redução do uso indiscriminado de agro-defensivos (GADELHA *et al.*, 2003). Exemplos de defensivos naturais são enxofre, calda sulfocálcica, calda bordalesa, macerado de folhas, urina de vaca entre outros (PAULUS *et al.*, 2000).

Uma vez que os alimentos podem veicular microrganismos como as bactérias, isto representa um risco à saúde, podendo afetar a saúde do consumidor.

¹ Produto cultivado sem o uso de adubos químicos ou agro-defensivos, considerado saudável, que provém de um cultivo que observa as leis da natureza. (AMBIENTE BRASIL, 2000).

Estas contaminações podem ocorrer por diferentes vias, como água, solo, armazenamento e manipulação dos alimentos. Os microrganismos quando presentes no organismo dos seres humanos invadem os tecidos provocando desde infecções simples como até a morte.

Diante desta preocupação pesquisas vem sendo feitas a fim de buscar uma forma de preservar e garantir a qualidade dos alimentos, um dos melhores exemplos de produtos orgânicos que pode contribuir na preservação dos alimentos é a própolis.

A própolis apresenta ação antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, anestésica e antiinflamatória, sendo conhecida como um antibiótico natural (BIANCHINI E BEDENDO, 1998).

A própolis é produzida a partir de resinas vegetais coletadas pelas abelhas na região do entorno das colméias. Estas resinas são alteradas pela sua saliva formando a própolis. Elas usam a própolis para o reparo da colméia, na assepsia do local para postura e na mumificação de insetos que invadem as colméias.

Sua composição típica é de 55% de resinas vegetais; 30% de cera de abelhas; 8 a 10% de óleos essenciais e 5% de pólen aproximadamente, podendo ocorrer variações na composição dependendo da origem da matéria-prima coletada e espécie da abelha (PARK *et al.*, 1998).

Sforcin *et al.* (2000) afirma que a própolis nos últimos tempos tem sido usada em diversas áreas da medicina, tanto no combate a agentes causadores de infecções no trato respiratório, como também em indústrias de cosméticos, como em loções de limpeza do rosto e em xampus.

A própolis alecrim é altamente eficaz no combate a uma série de microrganismos, é produzida pelas abelhas, a partir da coleta de resinas do alecrim do campo (*Baccharis Dracunculifolia*) e muito valorizada no mercado internacional, principalmente o Japão.

O Brasil é um país tropical, onde as altas temperaturas e a umidade facilitam o crescimento de bactérias, por isso, há necessidade de se desenvolver métodos que permitam retardar ou eliminar o crescimento de bactérias nos processos de pós-colheita. A contaminação dos alimentos por algumas bactérias pode ser prejudicial aos humanos, como também contribui para a diminuição do tempo de

prateleira dos produtos in natura², ou seja, o tempo em que os alimentos ficam expostos.

As atividades de pré e pós-colheita necessitam de cuidados e programas que garantam que o produto agrícola não cause nenhum efeito adverso à saúde do consumidor, como também preservar a segurança na lavoura, do meio ambiente e dos trabalhadores rurais (EMBRAPA, 2004).

Os produtos agrícolas devem ser transportados do campo até o estabelecimento comercial em condições que minimizem a possibilidade de contaminação por agentes biológicos. É preciso controlar as condições de transporte e armazenamento a fim de impossibilitar ou reduzir o crescimento dos microrganismos na superfície dos alimentos (EMBRAPA, 2004), mas nem sempre estas restrições são seguidas, perdendo-se com isso muitos produtos agrícolas.

Segundo Vilela e Henz (2000), a contaminação dos alimentos do produtor até o consumidor pode ocorrer por diferentes fatores, como colheita mal realizada, armazenamento e transporte inadequados. No ambiente da venda ao consumidor, as bancadas onde são armazenados os alimentos, nem sempre apresentam características mínimas de higiene.

As contaminações bacterianas nos alimentos podem provocar reações adversas. As bactérias da família *Enterobacteriaceae* e da família *Vibrionaceae* são as principais responsáveis pela maioria das contaminações alimentares (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Devido às características terapêuticas da própolis buscou-se estudar sua ação nas bactérias coletadas em ambientes de comercialização de hortifrutigranjeiro.

Considerando a problemática da contaminação dos alimentos, o presente trabalho buscou verificar a presença de bactérias na superfície das frutas, verduras e bancadas onde essas são armazenadas, analisar e caracterizar a ação da própolis sobre elas. A partir dos resultados buscar uma forma de incorporar os extratos de própolis na cadeia de hortifrutigranjeiros com a finalidade de preservar os alimentos e a saúde dos consumidores.

² Alimentos de origem vegetal ou animal, que para o consumo imediato necessita-se apenas, a remoção da parte não comestível e higienização. (ANVISA, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e identificar a ação da própolis alecrim sobre os bacilos gram-negativos móveis isolados em ambiente de comercialização de hortifrutigranjeiro. E, a partir do resultado obtido propor uma forma de incorporação do extrato de própolis no processo de pós-colheita.

2.2 Objetivos específicos

- Quantificar o teor de flavonóides dos diferentes extratos de própolis;
- Isolar e identificar as bactérias comuns em hortifrutigranjeiros;
- Avaliar a ação da própolis sobre os bacilos isolados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ecologia bacteriana

As bactérias são organismos unicelulares, procariontes (não possuem núcleo, nem organelas membranosas) com dimensões de micrômetros, apresentam diversas formas, como cocos (esféricas), cilíndricas, bacilos (bastão) e espiral (formato de saca-rolhas ou curvadas), na forma isolada ou em colônias. Vivem na presença ou ausência de oxigênio.

Muitas bactérias apresentam um ou inúmeros flagelos, portanto, são móveis. Algumas são móveis, mas não apresentam flagelos, esses são capazes de se movimentar por deslizamento. A movimentação por flagelos ou deslizamento permite com que as bactérias se locomovam, facilitando sua disseminação.

No corpo humano existem milhares de espécies de bactérias, conhecidas como microbiota ou flora normal, que são benéficas ao organismo.

Muitas espécies são usadas na produção de medicamentos, por exemplo, insulina e proteína; na preparação de bebidas e alimentos. Algumas são prejudiciais mais conhecidas pelas infecções graves, como sífilis, cólera, tétano, febre tifóide, tuberculose e etc.

Em geral, são transmitidas por contato direto ou indireto. As mãos estão constantemente em intenso contato com o ambiente, podendo veicular muitos agentes infecciosos.

Na pele, a microbiota normal é dividida em residente e transitória. A microbiota residente é constituída por microrganismos aderidos profundamente na camada da pele, normalmente apresentam baixa patogenicidade, mas em alguns casos podem se tornar invasivos e causar infecções (TORTORA *et al.*, 2005). Já os microrganismos que se depositam na superfície da pele, provenientes do meio ambiente, geralmente são bactérias gram-negativas e fazem parte microbiota transitória (SANTOS, 2004).

Em geral as bactérias absorvem nitrogênio do ar, sendo que algumas degradam resíduos de plantas mortas, óleos de derramamento, despejos de esgotos e restos de alimentos (PELCZAR *et al.*, 1997).

Em habitats naturais raramente encontramos os microrganismos em cultura pura (um único microrganismo), portanto faz-se necessário um procedimento de isolamento para separar e identificar os distintos microrganismos presentes em uma mesma amostra. As técnicas de isolamento bacteriano permitem separar um microrganismo a partir de uma população que o contém.

As técnicas de microscopia revelam uma diversidade de estruturas funcionando juntas, algumas estruturas são externas à parede celular enquanto outras são internas, por se tratarem de organismos vivos suas estruturas e funções são mantidas por meio de atividades químicas (metabolismo). Estas atividades podem liberar ou consumir energia do organismo, portanto a célula precisa de energia para realizar uma infinidade de trabalhos dentre os quais pode-se destacar a motilidade, reparo de danos, armazenamento de nutrientes, crescimento e multiplicação entre outros.

As bactérias apresentam quatro etapas durante o crescimento, conforme Figura 1. A taxa de crescimento bacteriana varia conforme a variação do número de células pelo tempo e assim, pode ser dividida em quatro fases (TORTORA *et al.*, 2005).

- A. Fase LAG: momento de adaptação após a inoculação em novo meio, as células sofrem pequenas variações no tamanho, mas não se multiplicam;
- B. Fase LOG ou EXPONENCIAL: momento em que as células começam a se multiplicar atingindo um crescimento máximo;
- C. Fase ESTACIONÁRIA: momento em que o número de células que morrem é igual ao número de células novas (em divisão);
- D. Fase da MORTE CELULAR OU DECLÍNIO: momento em que as quantidades de nutrientes diminuem tornando-se insuficiente para as bactérias crescerem, as células vivas se multiplicam lentamente enquanto que as células mortas excedem a população de células vivas.

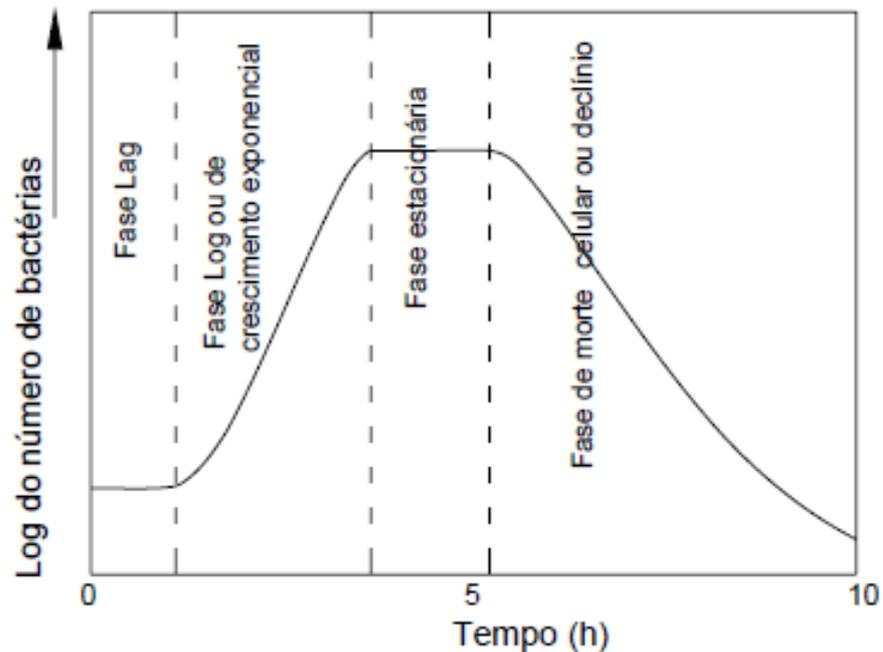


Figura 1. Curva de crescimento bacteriano (TORTORA *et al.*, 2005)

O controle do crescimento bacteriano pode ser feito utilizando os chamados agentes antimicrobianos. Estes podem eliminar ou retardar o crescimento bacteriano, os que as eliminam são chamados de bactericidas e os que inibem ou retardam o crescimento são chamados de bacteriostáticos.

No caso da ação bacteriostática o crescimento bacteriano é inibido. Ocorre uma limitação no crescimento de bactérias, pois os agentes antimicrobianos interferem na produção de proteína e na replicação do DNA.

No efeito bactericida o crescimento bacteriano é inibido, porque os agentes que causam este efeito se ligam fortemente a seus alvos celulares e inativam os mecanismos de divisão celular.

O crescimento bacteriano também pode ser inibido através da lise celular, tornando o efeito bacteriolítico. Apresentando esse efeito estão os antibióticos que inibem a síntese da parede celular, como a penicilina, bem como agentes químicos que destroem a membrana citoplasmática (TORTORA *et al.*, 2005).

3.1.1 Morfologia bacteriana

Para analisar as diferenças da morfologia das bactérias um método usado é o teste de coloração de Gram que consiste na diferenciação de bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas. Este método diferencia as bactérias em função das diferenças entre as paredes celulares, conforme Figura 2.

As paredes celulares das bactérias gram-positivas apresentam uma camada espessa de peptidoglicanos, proteínas e ácidos teicóicos, enquanto a parede celular das bactérias gram-negativas, apresentando uma fina camada de peptidoglicano, e um espaço periplasmático (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

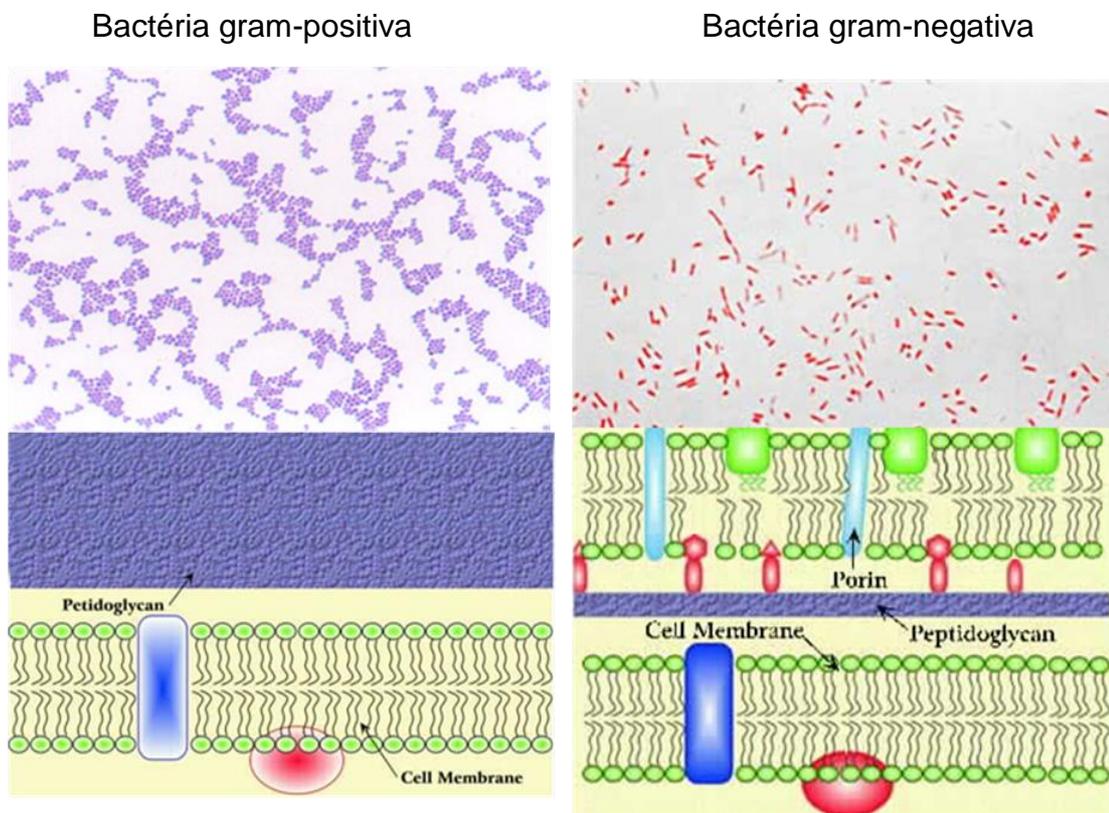


Figura 2. Diferença entre as paredes celulares das bactérias gram-positivas e gram-negativas. Fonte: <www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm,> acessado em 02 fev. 2010.

A parede celular das bactérias gram-negativas é mais complexa que a parede das bactérias gram-positivas, apesar de apresentar uma fina camada de

peptideoglicano quando comparada com as gram-positivas, elas apresentam uma dupla camada de fosfolípidos.

Para a realização do teste são necessárias algumas etapas, inicialmente é realizado em lâmina de vidro um esfregaço bacteriano. O primeiro corante, o cristal violeta recobre todo o esfregaço, tornando-o de coloração roxa.

Após adiciona-se a solução de lugol (solução aquosa de lugol: 1% de I₂ e 2% de KI - Iodeto de Potássio), onde se fixa no citoplasma e nas estruturas celulares, em seguida a solução de lugol é removida com álcool.

Tanto as bactérias gram-positivas quanto as bactérias gram-negativas absorvem igualmente o cristal violeta e o lugol, adquirindo uma coloração violeta devido à formação do complexo cristal violeta-iodo em seus citoplasmas. O último corante usado é a safranina ou fucsina com coloração vermelha.

A diferenciação da coloração entre as bactérias é devido à resistência ao descoramento pelo álcool. Este solvente dissolve a porção lipídica das membranas externas das bactérias Gram-negativas, fazendo com que o complexo cristal violeta seja removido do citoplasma, predominando o último corante usado a safranina, tornando-as vermelha. Enquanto que para as paredes das bactérias Gram-positivas o solvente desidrata-as e provoca a contração dos poros do peptideoglicano da membrana celular, tornando-as impermeáveis e desta forma impedindo que o cristal violeta seja removido, tornando-as de coloração violeta (PELCZAR *et al.*, 1997).

Tortora *et al.* (2005) explica que os bacilos gram-negativos são responsáveis pela maioria das doenças bacterianas. Diferente dos cocos, eles apresentam poucos arranjos ou agrupamentos. Existem bacilos semelhantes a lanças, outros com as pontas arredondadas.

Além da análise da morfologia bacteriana, as técnicas empregadas atualmente são as análises moleculares que permitem analisar as informações genéticas das bactérias. Em geral as bactérias apresentam o seu material genético, o DNA (ácido desoxirribonucléico), incorporado em uma única molécula circular de DNA de fita dupla, chamado plasmídeo, onde carrega informações capazes de comparar o grau de relacionamento genético entre espécies ou linhagens de bactérias.

Os DNAs de diferentes espécies bacterianas não apresentam homologia, quando apresenta um alto grau de homologia essas linhagens são consideradas da mesma espécie.

3.2 Contaminação dos alimentos

Os alimentos de origem animal ou vegetal, in natura ou processados, incluindo a água, podem veicular diversos microrganismos patogênicos ou não, quando os microrganismos são patogênicos podem causar diversas perturbações fisiológicas para as pessoas que os consomem (Pinto, 1996).

Segundo Jay (2005), a flora microbiana das frutas e hortaliças é idêntica do solo onde foram colhidos. A composição geral das frutas são grande quantidade de água, além de carboidratos, proteínas e gorduras, por isso, proporcionam o crescimento de microrganismos, principalmente de bactérias, pois o pH das frutas é igual a 7 sendo favorável para o seu crescimento.

As frutas diferem das hortaliças apenas por apresentarem uma quantidade menor de água, no entanto o pH das hortaliças é menor que 7, isto explica a menor incidência das bactérias no início da deterioração das hortaliças (JAY, 2005).

Os microrganismos presentes nos alimentos representam um risco à saúde, podendo afetar quem se serve deles. Os alimentos podem ser contaminados por diversas vias, como água, solo, utensílios contaminados, armazenamento, processamento, distribuição ou manuseio dos alimentos (OLIVEIRA & JUNQUEIRA, 2005).

Os alimentos quando contaminados por microrganismos, ao serem ingeridos, invadem os fluídos ou os tecidos do hospedeiro causando algumas doenças graves, provenientes da ingestão destes alimentos (PINTO, 1996).

Para Balbani e Rutugan (2001) a Tabela 1 resume as principais bactérias patogênicas ao ser humano, capazes de contaminar os alimentos.

Tabela 1. Principais bactérias presentes nos alimentos

<i>Clostridium botulinum</i>	Gram-positivo	Móvel
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positivo	Não móvel
<i>Bacillus cereus</i>	Gram-positivo	Móvel
<i>Vibrio sp</i>	Gram-negativo	Móvel
<i>Escherichia sp</i>	Gram-negativo	Móvel
<i>Salmonella sp</i>	Gram-negativo	Móvel
<i>Campylobacter sp</i>	Gram-negativo	Móvel
<i>Yersinia sp</i>	Gram-negativo	Não móvel
<i>Shigella sp</i>	Gram-negativo	Não móvel
<i>Listeria monocytogenes</i>	Gram-positivo	Móvel
<i>Aeromonas sp</i>	Gram-negativo	Móvel
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Gram-negativo	Móvel

*Adaptado de Balbani e Butugan (2001)

Segundo Almeida *et al.* (1995), nos serviços de alimentação a manipulação deve ser realizada após higienização correta das mãos, além de não tossir sobre os alimentos e não ter contato com ferimentos e curativos, o estabelecimento deve ser provido de pias, sabonetes, toalhas para facilitar a higiene pessoal e diminuir a disseminação dos microrganismos (FEITOSA *et al.*, 2008).

As bactérias patogênicas aos seres humanos podem ser provenientes da má higienização das mãos dos manipuladores (PINTO, 1996). O mesmo ocorre nos hospitais onde segundo Feitosa *et al.* (2008) as bactérias da família *Enterobacteriaceae* foram encontradas nas mãos de enfermeiros, jalecos, em instrumentais cirúrgicos no Hospital de Morrinhos/GO, isto mostra o risco de veicular patógenos nos pacientes que são provenientes também da falta de práticas de higienização das mãos.

Conforme Pinto (1996) as doenças de origem alimentar podem ser provocadas por diversos microrganismos como bactérias, fungos, protozoários e vírus. As bactérias devido sua diversidade e patogenicidade é o grupo microbiano mais associado às doenças oriundas desses alimentos.

A higienização das mãos é a ação mais importante para o controle da disseminação dos microrganismos, na pele abriga microrganismos que podem ser transferidos de um lugar para outro, por contato direto ou indireto e quando patogênicos provocam reações adversas ao organismo (SANTOS, 2004).

Um estudo realizado por Almeida *et al.* (1995), em um restaurante na cidade de Campinas/SP, onde foi analisado as mãos de manipuladores de alimentos, comprovou-se a presença de microrganismos patogênicos nas mãos, podendo estes serem transferidos para os alimentos, oriundos das condições de higiene das mãos no processo e manipulação.

Uma pesquisa realizada por Balbani e Butugan (2001) em 26 hortas apresentou irregularidades, onde 17% apresentaram alto índice de contaminação por coliformes fecais e 12% presença de parasitos, ambos provenientes de animais, da água e do próprio solo. As hortas normalmente são irrigadas com água contaminada por material fecal e pesticida e adubadas com dejetos humanos, conseqüentemente contaminando as hortaliças.

3.2.1 Exemplos de bacilos gram-negativos mais recorrentes nas infecções alimentares

Para Sousa (2006) os principais microrganismos presentes nos alimentos e na água contaminada e responsável pela maioria das infecções são *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Vibrio cholerae*, *Proteus dentre* outros.

Em geral as bactérias do grupo coliforme habitam o intestino do homem, são bastonetes gram-negativos e são pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (Sousa, 2006). É uma família de bactérias gram-negativas, que incluem uma variedade de bactérias patogênicas. Estão amplamente distribuídos no solo, água, plantas e no intestino do homem e animais. Os principais gêneros da família *Enterobacteriaceae* são: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia* entre outros.

3.2.1.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é o principal indicador de contaminação fecal, de fácil isolamento em meio de culturas convencionais, presente na contaminação dos alimentos.

São bactérias presentes no intestino dos seres humanos, mas em algumas situações podem causar infecções como, por exemplo, infecções no sistema urinário, sistema digestivo, sistema pulmonar, sistema nervoso (meningites) e infecções generalizadas.

Estas bactérias são produtoras de verocitotoxina, conhecida como VTEC, causada principalmente pela cepa *E. coli* 0157, que causam infecção no sistema digestivo, provocando colite hemorrágica, cólica e diarreia. São encontradas principalmente no boi, em vegetais e na água (FORBES e JACKSON, 1998).

3.2.1.2 *Salmonella*

É um grupo de bactérias que podem causar gastroenterites, encontradas em alimentos como leite, produtos de laticínios, carne de aves, suínos, bovinos, vegetais e pescado, ovos, água e moluscos (HOFFMANN, 2001).

A *Salmonella enteritidis* é a mais comum e é transmitida por ovos consumidos crus ou mal cozidos. Os ovos contaminados podem contaminar outros alimentos por contato. O frango e outras aves, se mal cozidos, mal fritos ou mal assados também podem transmitir a bactéria.

São bactérias entéricas (presentes no trato intestinal), gram-negativas, em forma de bacilos, são patogênicas e não toleram grandes concentrações de sais (JAY, 2005).

Dentre elas as de maior importância para a saúde humana destacam-se também a *Salmonella typhi*, que causa infecções sistêmicas e febre tifóide e a *Salmonella typhimurium*, causadora das gastroenterites.

A infecção é causada por uma ingestão significativa do microrganismo causando em geral, náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e

diarréia, acompanhados por fraqueza, fadiga muscular, febre, sonolência e mudança de humor.

3.2.1.3 *Proteus*

As bactérias do gênero *Proteus* são bacilos gram-negativos móveis, apresentam crescimento que se espalha em camadas, formando um véu. São pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Estas bactérias causam infecções oportunistas, principalmente, em imunodeprimidos. São entéricas, localizadas no intestino dos seres humanos e animais; facilmente encontradas em vegetais mal lavados e carnes (JAY, 2005).

Tais bactérias causam infecções urinárias, produzindo grande quantidade de uréase, degradando a uréia em amônia e CO₂, aumentando a alcalinidade da urina, tornando-se tóxica para a parede da bexiga (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

As duas espécies conhecidas e que estão associadas aos diabéticos e diversas anomalias do trato urinários, são a *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris*.

3.2.1.4 *Citrobacter*

A *Citrobacter* apresentam-se em forma de bacilos, são gram-negativos que compõem 11 espécies, porém não são considerados patogênicos, porque apresentam pouca importância clínica (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

Segundo Jay (2005) apenas duas espécies são patogênicas a *Citrobacter freudii* e a *Citrobacter diversus*. São geralmente encontradas em alimentos como vegetais mal lavados e carnes frescas.

As espécies patogênicas podem causar infecções urinárias, infecções respiratórias e meningites em casos de recém-nascidos (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

3.2.1.5 *Vibrio cholerae*

Esta bactéria é membro do gênero *Vibrio*, da família *Vibrionaceae*. As diferentes espécies deste gênero são bastonetes gram-negativos, móveis, em forma de vírgula. Normalmente são encontrados no ambiente, livres, aderidas em plantas, insetos ou em biofilmes. Existem cepas encontradas no ambiente que não são patogênicas, apenas duas linhagens podem causar problemas aos seres humanos (FORBES e JACKSON, 1998).

O mais conhecido como vibrião colérico e o *Vibrio parahaemolyticus*. O primeiro é o agente causador da cólera, uma doença hemorrágica aguda resultando da colonização do intestino delgado, produz uma toxina específica, a exotoxina, que interfere na homeostasia de sódio e água das células do revestimento, resultando em uma secreção maciça e perda de líquido. A segunda linhagem está associada à ingestão de peixes, moluscos e crustáceos contaminados.

As infecções causam diarreia indolor, câibras musculares, choque circulatório, taquicardia, hipotensão, insuficiência renal, podendo levar o paciente à morte (FORBES e JACKSON, 1998).

3.3 A Própolis

A própolis é uma mistura de resinas vegetais, coletadas pelas abelhas nas plantas (BIANCHINI e BEDENDO, 1998). As abelhas misturam a cera e as resinas com a enzima presente na sua saliva, ocasionando a hidrólise dos flavonóides formando a própolis (PARK *et al.*, 1998).

Desde tempos antigos a própolis é usada e recentemente é apontada em diversos estudos devido às suas propriedades terapêuticas.

Na Grécia antiga a própolis era usada como cicatrizante interno e externo; na Roma antiga afirmavam que tinha um poder de aliviar dores e reduzir inchaços; na França surgiu o primeiro trabalho e patente sobre as propriedades químicas e sua composição. No Japão, é matéria-prima de produtos alimentícios e cosméticos (PARK *et al.*, 1998).

A própolis foi muito usada como cicatrizante em Guerras, como na Guerra da África do Sul e na 2ª Guerra Mundial. Na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas, foi empregada na medicina veterinária e na medicina humana, sendo usada em tratamentos de tuberculoses pulmonares e falta de apetite (PEREIRA, SEIXAS & AQUINO NETO, 2002).

Os flavonóides são considerados os compostos responsáveis pelas propriedades terapêuticas da própolis. Atua em diferentes processos fisiológicos das plantas, como na absorção de vitaminas, no processo de cicatrização, como antioxidantes, ação antimicrobiana, antifúngica, antiviral, moduladora do sistema imunológico, regulação do crescimento (BARBOSA *et al.*, 2009).

A ação antibacteriana da própolis está associada ao seu alto conteúdo de flavonóides, mas encontramos também outros constituintes como os ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, alcoóis e cetonas. A composição varia muito conforme a região onde a própolis fora coletada e a variabilidade genética das rainhas (PARK *et al.*, 1998). A composição química da própolis é complexa e sua coloração pode variar do amarelo claro, marrom esverdeado ao negro (SOUSA *et al.*, 2007).

Os flavonóides pertencem a uma classe de compostos polifenólicos presentes em grande abundância no reino vegetal, principalmente em angiospermas. São encontrados nos pigmentos amarelos, conforme o nome *flavus*, que significa amarelo e *oide*, que significa forma. Existe também a presença em pigmentos laranja, azuis e vermelhos (HUBINGER, 2009).

Existem diversas subclasses de flavonóides, suas estruturas químicas podem variar, de acordo com o processo de substituição dos grupos funcionais existentes nos anéis, conforme Figura 3 (HUBINGER, 2009).

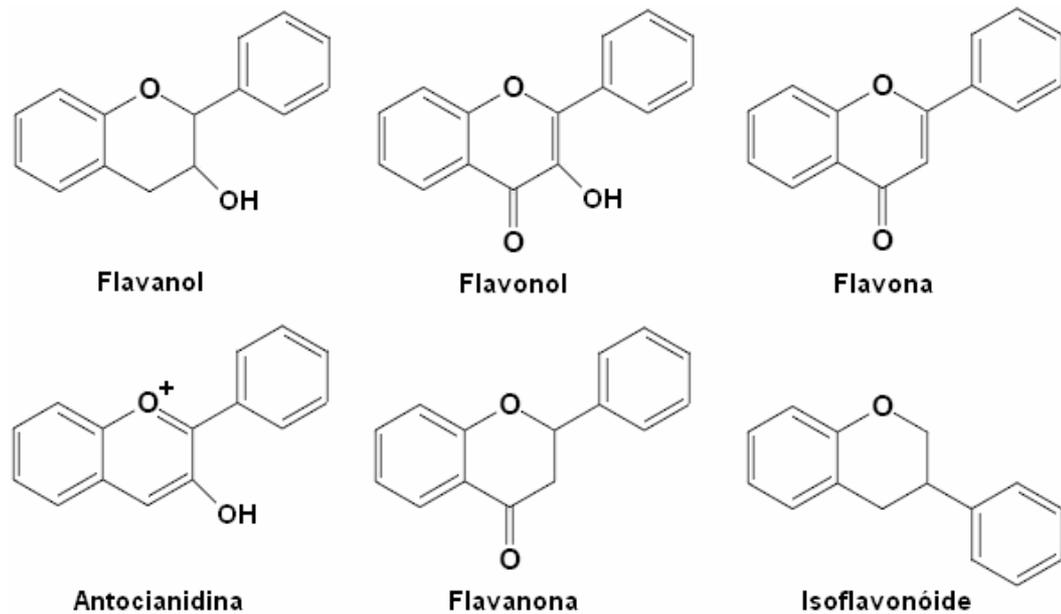


Figura 3. Estruturas de algumas subclasses dos flavonóides

O interesse econômico das subclasses é devido às diferentes propriedades como, por exemplo, as cores que contribuem na nutrição e sabor dos alimentos.

Souza *et al.* (2010) quantificou a própolis com solução de quercetina em metanol por meio de ensaio em espectrofotometria e a absorvância observada foi em 425 nm e analisou diversos fatores como diferentes locais onde a própolis fora coletado e período de coleta.

Bianchini e Bedendo (1998), afirmam que as investigações sobre as propriedades antibióticas da própolis foram realizadas na área médica e veterinária, onde obtiveram resultados eficientes sobre a atividade bacteriostática e bactericida em duas bactérias de constituição distintas, gram-positiva e gram-negativa.

A própolis tem ação inibitória para os gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Mycobacterium*, sendo parcialmente inibitório ou inativo para os gêneros como *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Salmonela*. A técnica de extração, metodologia empregada ao experimento, local de origem da própolis e época de produção são fatores que podem ter influência sobre o maior ou menor grau de inibição do produto em relação às diferentes espécies bacterianas (BIANCHINI e BEDENDO, op cit.).

3.3.1 Própolis alecrim

A própolis alecrim ou própolis verde é produzida pelas abelhas *Apis mellifera* que visitam a espécie vegetal de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo ou vassourinha), família *Asteraceae*, para a elaboração da própolis. É tida como a própolis mais eficiente no controle microbiano (ALENCAR *et al.*, 2005).

O alecrim-do-campo é uma planta invasora em várias regiões do Brasil, como: sul, leste, centro e zona da mata de Minas Gerais, leste de São Paulo, norte do Paraná e em regiões serranas do Espírito Santo e Rio de Janeiro (ALENCAR *et al.*, 2005).

A artepilina é uma substância característica da própolis verde, como também um teor baixo de flavonóides, responsáveis pelas propriedades terapêuticas. A própolis verde é altamente valorizada no exterior. No Japão é usada como suplemento alimentar na profilaxia de doenças e movimentada um mercado de setecentos milhões de dólares (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Análises cromatográficas mostraram que o extrato etanólico de própolis verde e o extrato metanólico vegetal de *Baccharis dracunculifolia* apresentaram um perfil químico similar, sendo confirmadas dezoito substâncias químicas idênticas nas duas amostras. Assim é possível afirmar que a resina da espécie vegetal de *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte de resina para a elaboração das própolis produzidas nas regiões sudeste do Brasil (ALENCAR *et al.*, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e isolamento bacteriano

Para a coleta do material dez pontos diferentes foram escolhidos de um estabelecimento que comercializa hortifrutigranjeiro em São Carlos/SP, como geladeira, freezer, balança, bancada da alface, bancada do repolho, superfície de maçã, pêra, goiaba e mamão. Com o auxílio de “swabs” esterilizados, a superfície dos pontos foi amostrada. Cada “swab” foi mantido em um tubo de ensaio esterilizado.

O material coletado nos “swabs” foi inoculado em caldo Luria-Bertani (LB) líquido, composto por 1L de água destilada, 5g de extrato de levedura (Acumedia), 10g de NaCl (Dinâmica Química) e 10g triptona (Acumedia), e foram mantidos sob agitação em estufa própria para crescimento de microrganismos, a 37°C durante 24 horas.

Após 24 horas as culturas de microrganismos em meio LB líquido foram estriadas em placas de Petri com Ágar LB, para sua preparação usou-se as mesmas quantidades para o meio LB líquido acrescentando-se 15g de ágar (Acumedia) mantendo-os em estufa de crescimento microbiano, a 37°C por um período de 24 horas.

4.1.1 Isolamento bacteriano

A técnica de isolamento usada foi a semeadura por esgotamento ou por estrias, para obter colônias puras. As colônias selecionadas para isolamento diferenciavam-se nos aspectos de pigmentação e superfícies das colônias.

Inicialmente houve a esterilização da alça bacteriológica na chama e uma pequena porção bacteriana fora removida da colônia original, e em uma das laterais da placa de Petri a pequena porção bacteriana fora estriadas, novamente realizou-se a esterilização da alça e a partir da primeira estria uma nova estria fora feita, após cada estria realizada necessitou-se da esterilização da alça bacteriológica. No total foram realizadas três estrias a fim de isolar o microrganismo

de interesse, permanecendo apenas na placa colônias isoladas e com a mesma característica (Figura 4).

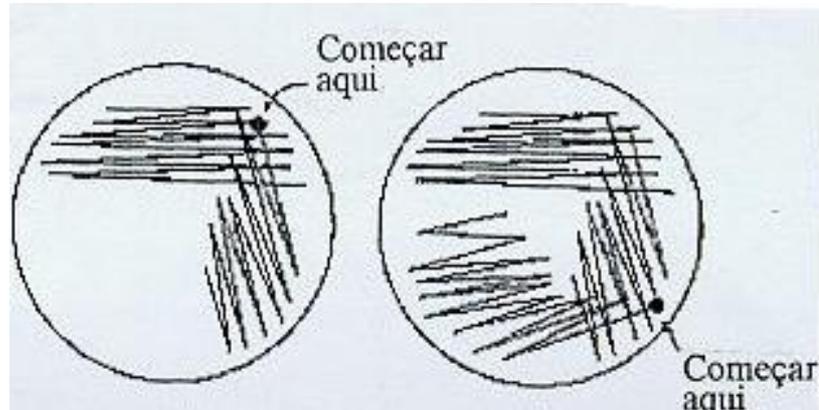


Figura 4. Semeadura por esgotamento em placa: segundo e terceiro conjunto de estrias. Fonte: Universidade de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.icb.ufmg.br/mic/mic/m-42.html>, acessado em 16 mar. 2010.

Após a obtenção das placas com colônias puras, ou seja, isoladas estas foram conservadas em refrigerador a 4°C, em meio sólido LB obtido com uso de extrato de levedura para melhor manutenção da umidade e conservação da cultura.

4.2 Caracterização dos isolados

4.2.1 Coloração de Gram e morfologia celular

Diante de uma diversidade de microrganismos uma triagem fora realizada com intuito de trabalhar apenas com os microrganismos de interesse.

O primeiro teste realizado foi o Teste da coloração de Gram, seguindo os critérios de MORETTI (2008), cujo método consiste no tratamento do esfregaço de uma pequena porção da colônia bacteriana isolada crescida em meio de cultura LB sólido. Este esfregaço foi tratado como descrito abaixo:

Uma pequena porção da colônia isolada fora transferida para uma lâmina de vidro contendo uma gota de água destilada, ambos foram emulsionados até a

formação de uma solução homogênea, após a solução secar a lâmina fora flambada três vezes para a fixação da solução.

Após a fixação do material inicia-se as etapas de coloração. Na primeira etapa o corante utilizado fora o cristal violeta. Para sua preparação foram feitas duas soluções, sendo para o preparo da solução A pesou-se 2 g de cristal violeta (Vetec) e diluiu-se em 20 mL de etanol 95% (Qhemis). Para preparo da solução B pesou-se 0,8 g de oxalato de amônio (Vetec) e adicionou-se em 100 mL de água destilada. As duas soluções foram misturadas, a mistura foi deixada em repouso por 24 horas. A solução resultante da mistura foi utilizada para recobrir todo o esfregado e foi removida com água destilada após um minuto.

Na segunda etapa usou-se um corante mordente, denominado lugol. Para sua preparação pesou-se 1g de iodo (Synth), 2 g de iodeto de potássio (Synth) e diluiu-se em 100 mL de água destilada. O lugol recobriu todo o esfregaço e foi removido, após um minuto, com água destilada.

Na terceira etapa o esfregaço fora tratado com o solvente orgânico etanol-acetona, onde para sua preparação usou-se 10 mL de acetona (J. T. Baker) diluído em 100 mL etanol 95% (Qhemis) por 20 segundos. Na etapa da descoloração seguiu-se rigorosamente o protocolo, pois a exposição prolongada (acima de um minuto) pode remover o cristal violeta dos dois tipos de parede celular, dando um falso resultado. Portanto o esfregaço é lavado rapidamente com o solvente e o excesso é removido com água destilada.

Na quarta etapa usou-se o corante fucsina, para sua preparação pesou-se 0,25g de fucsina (HOECHST) e diluiu-se em 100 mL de água destilada. O corante fucsina fora aplicado recobrimdo toda a superfície do esfregaço por 30 segundos, após foi removido com água destilada.

Após a última etapa aguardou-se a secagem do corante e em seguida a lâmina fora analisada no microscópio óptico.

Para confirmação da técnica de coloração de Gram foi realizado o teste de solubilidade em KOH ou método de Ryce, um método alternativo e rápido para detectar bactérias Gram-negativas sem o uso de corantes.

Nessa técnica uma gota de hidróxido de potássio a 3% (3g KOH (Synth) em 100 mL de água destilada) foi depositada sobre uma lâmina de microscópio em seguida uma colônia de uma cultura bacteriana foi adicionada e homogeneizada

com o auxílio da alça bacteriológica (Halebian,1981). Se uma massa viscosa se levantar junto à alça bacteriológica, a bactéria é Gram-negativa. Isso ocorre, pois a parede celular é destruída e como consequência há liberação do material genético, DNA, o qual é viscoso em água.

As bactérias classificadas como Gram-negativas foram repicadas, caracterizadas e armazenadas em meio Agar Mac Conckey (Biobrás Diagnósticos).

4.2.2 Teste de motilidade

Para verificar a motilidade, visto que a maior incidência dos microrganismos nos alimentos apresenta motilidade, buscou-se realizar este teste para ajudar na triagem das bactérias isoladas. Para isto foram realizados dois testes.

No primeiro teste, usou-se um tubo de ensaio com meio de cultura LB semi-sólido inclinado, foi feita uma perfuração até o fundo do tubo e incubado a 32°C por 24 horas. As bactérias que apresentam motilidade crescem além da perfuração deixando o meio de cultura turvo, disponível em: <www.microbiologia.ufba.br/aulas/provas%20bioquimicas.doc>, acessado em 16 mar. 2010.

O segundo teste usado para confirmação do primeiro, consiste da inoculação da bactéria em meio LB inclinado, uma perfuração foi realizada no meio e estrias na superfície, com o auxílio da alça bacteriológica, em seguida foi adicionado 1 mL de água destilada estéril e incubada a 32°C por 24 horas. Após a incubação uma gota da água presente foi analisada em microscópio óptico. A motilidade é registrada quando várias células individuais movem-se em várias direções.

No experimento com as bactérias foram observados em microscópio Olympus de uso geral que permite ampliações de até 1000 vezes com lente de imersão em óleo.

4.3 Identificação dos isolados

Esta etapa do trabalho fora realizada na DNA Consult, uma empresa especializada em análises de DNA de origem humana e animal com alto grau de tecnológica, localizada na cidade de São Carlos/SP (<http://www.dnaconsult.com.br/>).

A identificação bacteriana fora realizada em cinco isolados bacterianos por meio de amplificação de DNA total utilizando primers universais 16S e posterior sequenciamento da região amplificada.

4.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para sequenciar um genoma microbiano, é necessário isolar o DNA de interesse, através do termociclador, ao atingir 90°C ocorre a lise celular e o material genético é liberado. Este material genético é replicado, através da técnica de PCR (polymerase chain reaction - reação em cadeia da polimerase) que baseia-se no processo de replicação de DNA. Durante a reação de PCR são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo então a ligação de primers (iniciadores), nos terminais 3' das duas fitas simples. Das duas fitas simples formam-se duas fitas complementares, o ciclo pode ser repetido de 25 a 30 vezes e a quantidade de fitas geradas variam conforme a quantidade de fragmentos a serem amplificados, mas a cada fita dupla surgem duas novas fitas e assim sucessivamente.

Para a purificação os isolados foram incubadas a 37°C por 30 minutos com ExoSap-IT (produto que degrada os primers e os nucleotídeos restantes) e 80°C por 15 minutos (desativar a enzima) e em seguida fora quantificada.

É recomendado que amostra tenha uma concentração de DNA entre 50-100 ng/ μ L.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o Kit DYEnamic™ ET dye terminator - GE (código US81090).

O ciclo de PCR utilizado está descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição do ciclo de PCR utilizado

Temperatura	Tempo	
95°C	20 segundos	30 X
50°C	15 segundos	
60°C	60 segundos	
4°C	Forever	

É recomendado para sequenciamento de produto de PCR que o DNA esteja em uma concentração aproximada entre 300-400 ng por reação.

A amostra foi precipitada em solução de acetato de amônia 7,5 mol.L⁻¹ e etanol absoluto e ressuspensa na solução do kit de sequenciamento (MegaBace Loading Solution).

No processo descrito acima o sequenciador automático utilizado fora o MegaBace™ 1000.

4.3.2 Análise das sequências

A análise da qualidade das sequências utilizou-se o site <http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/phph/>, programa desenvolvido pela Embrapa chamado Electropherogram quality analysis que utiliza o índice Phred. O Phred é capaz de ler os cromatogramas de cada "read" do sequenciador e atribuir bases aos picos, produzir um índice de qualidade com valores para cada base e escrever todo em um arquivo em formato certo para Phrap (sobrepõem os "reads", montando sequências pequenas em trechos maiores).

É capaz de ler vários formatos de arquivos de diferentes sequenciadores e extrair a sequência em formato FASTA ou PHD. A qualidade (a confiabilidade na identificação de cada base) é utilizada na montagem das sequências.

Após a identificação com o organismo mais similar, realizada através do banco de dados NCBI-BLAST (National Center for Biotechnology Information – Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

4.4 Caracterização da própolis

4.4.1 Obtenção dos extratos

A própolis usada fora fornecida pela empresa W. Wenzel Indústria e Comércio de Produtos Apícolas Ltda (www.melwenzel.com.br). Esta empresa trabalha com produtos com origem de vários locais do interior de São Paulo, Sul de Minas Gerais e algumas regiões do Nordeste.

A partir da resina da própolis da região sul do Minas Gerais obteve-se o extrato em pó. Inicialmente pesou-se 10 g de resina, triturou-se e diluiu-se em 100 mL de diferentes concentrações de álcool etílico 60, 70, 90% e PA (Qhemis), sendo mantido por 3 horas sob agitação. Em seguida a solução fora filtrada três vezes em Kitassato a vácuo, a parte sólida liofilizada, obtendo-se o extrato de própolis em pó, conservado em freezer (2ª extração).

A parte líquida fora rotaevaporada e a solução restante colocada em placa de Petri para secar na estufa a 40°C, permanecendo até secar totalmente, em seguida mantidas em freezer (1ª extração).

4.4.2 Quantificação do teor de flavonóides totais

Inicialmente, uma curva padrão com quercetina di-hidratada, tomada como substância de referência, foi construída.

Preparou-se uma primeira solução de quercetina, diluindo 0,5 g do padrão quercetina (Sigma) em 100 mL de álcool etílico (Qhemis). Em seguida preparou-se uma segunda solução, retirando uma alíquota de 1 mL da primeira solução e diluindo em 100 mL de álcool etílico (Qhemis), a fim de obter uma solução etanólica de quercetina a 50 µg/mL. Alíquotas de 2 a 6 mL de solução de quercetina a 50 µg/mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5% em álcool etílico. O volume final de cada balão foi ajustado com álcool etílico. Como branco do sistema foi utilizado 1 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído em balão de 25 mL. Decorridos 30

minutos, foi tomada a leitura de cada solução a 425 nm, em espectrofotômetro Genesys 10 UV - Thermo Scientific. O procedimento foi realizado em triplicata.

Para a quantificação de flavonóides nos extratos de própolis, foram preparadas soluções dos extratos de própolis (da 2ª extração em álcool 60%, 70%, 90% e PA e da 1ª extração em álcool 70%, 90% e PA) a 2 mg/mL, obtidas pela dissolução de 100 mg de resíduo seco dos extratos em 50 mL de álcool etílico (Qhemis). Foram transferidos 2 mL da solução de cada extrato para balão volumétrico de 25 mL contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5% em álcool etílico. O volume final de cada balão foi ajustado com álcool etílico. Foi utilizado o mesmo branco descrito acima. Decorridos 30 minutos, foi tomada a leitura de cada solução a 425 nm. O procedimento foi realizado em triplicata. (Funari & Ferro, 2006).

4.4.3 Teste de difusão em disco

Os microrganismos de interesse foram cultivados em meio líquido TSB (Tryptic Soya Broth - Acumedia), mantidas sob agitação a 130 rpm, a 37° C, overnight. Uma alíquota de 100 uL da suspensão diluída a 1×10^6 células/mL foi semeada na superfície do meio TSA (Tryptic Soya Agar - Acumedia), em placas de Petri, com auxílio de alça de Drigalsky.

Com o auxílio de discos de 5 mm de diâmetro de papel filtro esterilizados e colocados na superfície da placa de petri semeadas, em seguida, os extratos de própolis foram embebidos nos papéis (5 uL com o auxílio da pipeta).

As concentrações usadas nos discos foram:

- 1ª extração: concentração 1 mg/mL em álcool 70%, 90% e PA;
- 1ª extração: concentração 2 mg/mL em álcool 70%, 90% e PA;
- 2ª extração: concentração 1 mg/mL em álcool 70%, 90% e PA;
- 2ª extração: concentração 2 mg/mL em álcool 70%, 90% e PA;
- Apenas álcool 70%, 90% e PA.

O teste foi realizado em duplicata para cada microrganismo. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Os halos de inibição foram medidos

com Paquímetro digital e o diâmetro dos discos foram subtraídos e os valores expressos em mm.

4.4.4 Curva de crescimento dos isolados na presença de própolis

Para este teste usou-se apenas o extrato obtido da 2ª extração, pois o extrato da 1ª extração deixou o meio de cultura leitoso, não sendo possível fazer sua leitura no espectrofotômetro de UV-Visível. A partir do extrato de própolis em pó foi preparada a solução 0,1 g/mL, onde para sua preparação pesou-se 10g do extrato de própolis em pó e diluiu-se em 100 mL álcool etílico (v/v) 70% (Qhemis).

A partir da concentração de 0,1 g/mL preparou-se diferentes soluções de própolis nas seguintes concentrações: 4; 3; 2; 1,5; 1; 0,5; 0,25; 0,15 e 0,01 mg/mL.

Adicionou-se as concentrações mencionadas acima cada uma em erlenmeyer contendo 50 mL de meio TSB e 5 µL da bactéria, preparou-se 2 erlenmeyers para cada concentração e cada bactéria, além de 2 erlenmeyers contendo 50 mL de meio de cultura TSB e apenas 5 µL de bactéria, usado como controle do crescimento bacteriano (controle). As soluções após preparadas nos erlenmeyers foram agitadas manualmente. A primeira alíquota de 3 mL fora retirada e a leitura zero realizada. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação a 130 rpm a 37°C. A cada hora uma alíquota de 3 mL fora retirada e uma nova leitura realizada, tendo uma duração total de 10 horas e 11 leituras.

As cinéticas de crescimento foram analisadas com espectrofotômetro de UV-visível (UV-vis SHIMADZU 1610PC) e a absorbância usada neste trabalho foi 640 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Coleta e isolamento bacteriano

A partir dos dez pontos escolhidos fora possível isolar 46 colônias a partir de seus aspectos de pigmentação e superfícies das colônias. Tabela 3.

Tabela 3. Microrganismos isolados no hortifrutigranjeiro

Local de Isolamento	Identificação do isolado	Superfície da colônia	Cor predominante da colônia	Formação de muco
Balança	BA1	Lisa	Branca	Gomosa
	BA2	Lisa	Branca	Gomosa
	BA3	Lisa	Laranja	Seca
	BA4	Lisa	Branca	Seca
	BA5	Lisa	Laranja	Seca
Superfície pêra	P1	Lisa	Branca	Gomosa
	P2	Lisa	Branca	Gomosa
Superfície goiaba	SG1	Lisa	Branca	Seca
	SG2	Rugosa	Branca	Gomosa
	SG3	Rugosa	Laranja	Seca
	SG4	Rugosa	Laranja	Gomosa
Superfície mamão	SMM1	Rugosa	Branca	Gomosa
	SMM2	Rugosa	Branca	Gomosa
	SMM3	Lisa	Branca	Gomosa
	SMM4	Lisa	Branca	Seca
Bancada Alface	A1	Rugosa	Amarela	Seca
	A2	Lisa	Branca	Seca
	A3	Rugosa	Branca	Gomosa
	A4	Rugosa	Laranja	Seca
	A5	Lisa	Laranja	Seca
	A6	Rugosa	Branca	Gomosa
	A7	Rugosa	Laranja	Seca
Geladeira	G1	Rugosa	Branca	Gomosa
Bancada repolho	R1	Lisa	Branca	Gomosa
	R2	Lisa	Bege	Seca
	R3	Lisa	Laranja	Seca
	R4	Lisa	Bege	Seca
	R5	Lisa	Laranja	Seca
	R6	Lisa	Laranja	Seca
	R7	Lisa	Laranja	Seca
	R8	Lisa	Laranja	Seca
	R9	Lisa	Bege	Seca
Bancada vagem	V1	Lisa	Laranja	Gomosa
	V2	Lisa	Laranja	Gomosa
	V3	Lisa	Laranja	Seca
	V4	Lisa	Amarela	Seca
	V5	Lisa	Bege	Seca
	V6	Lisa	Bege	Seca
	V7	Lisa	Branca	Gomosa
Superfície maçã	M1	Lisa	Branca	Seca
	M2	Lisa	Branca	Gomosa
	M3	Lisa	Branca	Gomosa
Freezer	F1	Rugosa	Branca	Gomosa
	F2	Rugosa	Amarela	Seca
	F3	Lisa	Branca	Gomosa
	F4	Rugosa	Bege	Gomosa

Os resultados apresentados na tabela 3 indicam que os microrganismos coletados apresentaram características bem diferenciadas e estavam presentes em todos os pontos da coleta. Uma vez colocados em meio de cultura formaram cultura mista - conjunto de população, no caso de manipulações laboratoriais faz-se necessário separá-las individualmente, formando culturas iguais, conhecidas como culturas puras.

Apesar da diversidade coletada, 46 amostras elas apresentam em geral características semelhantes, onde foram divididos em 12 grupos distintos apresentados no gráfico da Figura 5.

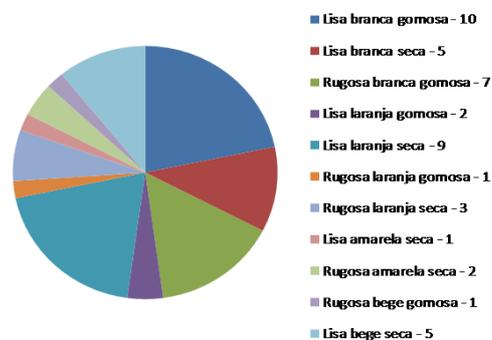


Figura 5. Gráfico que representa a quantidade de isolados e suas características de pigmentação e superfície das colônias.

Fora encontrado no ambiente de comercialização de hortifrutigranjeiro uma diversidade de bactérias que inicialmente foram separadas conforme suas características de pigmentação e superfície das colônias. Pode-se verificar que ocorreram amostras com características idênticas, muitas delas apresentaram características iguais umas das outras, mas que podem não ser bactérias iguais, portanto, faz-se necessário utilizar testes que possam diferenciá-las quanto a sua família, gênero e espécie, visto que existe uma variedade de bactérias.

5.2 Caracterização dos isolados

Os isolados bacterianos foram caracterizados quanto à sua morfologia e característica da parede celular. Isso foi feito para selecionar os bacilos Gram-negativos móveis, pois são os que causam algumas doenças bacterianas segundo TRABULSI & ALTERTHUM (2008).

5.2.1 Coloração de Gram e morfologia celular

Foi escolhido o teste de coloração de Gram para avaliação da morfologia e da característica da parede celular. O resultado da coloração é apresentado na Tabela 4.

Das 40 amostras testadas, pois as amostras da superfície pêra 1 e 2, goiaba 3 e 4 e mamão 3 e 4 foram eliminadas porque foram contaminadas por fungos e um novo isolamento não foi possível, 24 são Gram-positivas (15 cocos e 9 bacilos) e 16 Gram-negativas sendo todos bacilos.

Tabela 4. Forma e coloração dos isolados do hortifrutigranjeiro

Nº do isolado	Descrição do Isolado	Forma	Grupo
1	BA1	Cocos	Gram-positiva
2	BA2	Cocos	Gram-positiva
3	A5	Cocos	Gram-positiva
4	A6	Bacilos	Gram-positiva
5	SMM1	Cocos	Gram-positiva
6	V6	Cocos	Gram-positiva
7	M2	Bacilos	Gram-positiva
8	BA5	Cocos	Gram-positiva
9	A1	Cocos	Gram-positiva
10	V2	Bacilos	Gram-positiva
11	R6	Bacilos	Gram-positiva
12	M1	Bacilos	Gram-positiva
13	G1	Cocos	Gram-positiva
14	R7	Bacilos	Gram-positiva
15	A4	Cocos	Gram-positiva
16	R8	Bacilos	Gram-positiva
17	SMM2	Cocos	Gram-positiva
18	SG1	Cocos	Gram-positiva
19	BA3	Cocos	Gram-positiva
20	SG2	Cocos	Gram-positiva
21	BA4	Cocos	Gram-positiva
22	R5	Bacilos	Gram-positiva
23	V7	Bacilos	Gram-positiva
24	A2	Cocos	Gram-positiva
25	R3	Bacilos	Gram-negativa
26	V1	Bacilos	Gram-negativa
27	M3	Bacilos	Gram-negativa
28	F1	Bacilos	Gram-negativa
29	F2	Bacilos	Gram-negativa
30	R2	Bacilos	Gram-negativa
31	R1	Bacilos	Gram-negativa
32	R9	Bacilos	Gram-negativa
33	A3	Bacilos	Gram-negativa
34	V4	Bacilos	Gram-negativa
35	R4	Bacilos	Gram-negativa
36	V3	Bacilos	Gram-negativa
37	V5	Bacilos	Gram-negativa
38	A7	Bacilos	Gram-negativa
39	F3	Bacilos	Gram-negativa
40	F4	Bacilos	Gram-negativa

Conforme Tabela 4 as bactérias isoladas apresentaram forma de esfera (coco) e de bastão (bacilos), não sendo observada nenhuma espiral (espirila).

Podemos abrigar nas mãos bactérias gram-positivas e gram-negativas, na microbiota residente (pele) onde normalmente as bactérias são Gram-positivas enquanto na microbiota transitória as bactérias são Gram-negativas. Os resultados apresentados mostraram a grande diversidade de microrganismos encontrados em frutas e verduras do hortifrutigranjeiro, provavelmente oriundas da má higienização das mãos, isto reforça os resultados obtidos em uma pesquisa realizada por Almeida *et al.* (1995), onde as mãos de manipuladores de alimentos de um restaurante em Campinas/SP foram analisadas, comprovando a presença de microrganismos patogênicos nas mãos, podendo ser transferidos para os alimentos.

5.2.2 Teste de motilidade

O teste de motilidade foi realizado, pois há grande preocupação com os bacilos gram-negativos móveis, pois estes apresentam grande risco à saúde do consumidor e uma preocupação com a saúde pública conforme citado por Feitosa *et al.* (2008).

O teste de motilidade também foi realizado para completar a caracterização morfológica, Para esse teste, somente os bacilos gram-negativos foram selecionados uma vez que os bacilos gram-negativos de interesse necessitam ter motilidade, porque são os que causam a maioria das infecções. O resultado está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Motilidade dos isolados (os isolados que apresentaram motilidade estão indicados pelo símbolo +, enquanto que os isolados que não apresentaram motilidade estão sinalizados com o símbolo -).

Nº do isolado	Forma	Grupo	Motilidade
25	Bacilos	Gram-negativa	+
26	Bacilos	Gram-negativa	+
27	Bacilos	Gram-negativa	+
28	Bacilos	Gram-negativa	+
29	Bacilos	Gram-negativa	+
30	Bacilos	Gram-negativa	+
31	Bacilos	Gram-negativa	-
32	Bacilos	Gram-negativa	-
33	Bacilos	Gram-negativa	+
34	Bacilos	Gram-negativa	+
35	Bacilos	Gram-negativa	-
36	Bacilos	Gram-negativa	+
37	Bacilos	Gram-negativa	+
38	Bacilos	Gram-negativa	+
39	Bacilos	Gram-negativa	+
40	Bacilos	Gram-negativa	+

Dos isolados avaliados, 13 são os bacilos que apresentam algum tipo de motilidade. Desses 13 isolados, 5 isolados foram escolhidos aleatoriamente sendo utilizados no restante do trabalho como organismos teste para avaliação do efeito da própolis.

5.3 Identificação dos isolados

Para o sequenciamento e análise do DNA dos microrganismos isolados foram usadas a dupla fita F e R para confirmação da identificação. Tabela 6.

Tabela 6. Seqüência e identificação dos isolados

Nº isolado	Acesso <i>Gen Bank</i>	Microrganismo	Similaridade	Alinhamento
25	FJ422473.1	<i>Escherichia sp.</i>	96%	551
25	FJ422473.1	<i>Escherichia sp</i>	95 %	573
26	DQ013851.1	<i>Escherichia sp</i>	97%	843
26	DQ013851.1	<i>Escherichia sp</i>	97%	856
33	HQ143605.1	<i>Enterobacter sp</i>	84%	579
33	HQ143605.1	<i>Enterobacter sp</i>	84%	579
36	DQ013851.1	<i>Escherichia sp</i>	88%	645
36	DQ013851.1	<i>Escherichia sp</i>	89%	647
37	HM461217.1	<i>Enterobacter sp</i>	83%	584
37	HQ652601.1	<i>Enterobacter sp</i>	82%	558

As técnicas de PCR e o sequenciamento do DNA mostraram que as comparações da região 16S do genoma bacteriano é altamente conservada dentro de uma espécie e entre espécies do mesmo gênero, podem ser usadas para identificar espécies (Batista *et al.*, 2004).

A dupla fita de DNA dos isolados foram analisadas e para ambas as seqüências foram identificadas como sendo da família *Enterobacteriaceae*.

Dos isolados coletados inicialmente fora apresentados suas características visuais sendo apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Características e identificação dos isolados

Nº isolado	Nome isolado	Característica visual
25 - R3	<i>Escherichia sp</i>	Lisa laranja seca
26 - V1	<i>Escherichia sp</i>	Lisa laranja gomosa
33 - A3	<i>Enterobacter sp</i>	Rugosa branca gomosa
36 - V3	<i>Escherichia sp</i>	Lisa laranja seca
37 - V5	<i>Enterobacter sp</i>	Lisa bege seca

Analisando suas características e comparando com as análises moleculares pode-se dizer que os gêneros identificados foram *Escherichia sp* e *Enterobacter sp.*, as características apresentadas na Tabela 7 mostram que elas são diferentes entre si, isto justifica delas serem de espécies diferentes, ou seja, cepas diferentes pertencentes ao mesmo gênero e conseqüentemente da mesma família.

Esta família é encontrada no solo, na água, frutas, vegetais, grãos, flores e árvores, e em animais, desde insetos ao homem. Habitam os intestinos do homem e animais, são membros da microbiota normal ou como agentes infecciosos (Segabinazi *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, o sequenciamento de moléculas de RNA bacteriano, subunidade ribossômica 16S (RNAr 16S) tornou-se o "padrão de ouro", essa molécula tem, aproximadamente, dezesseis mil nucleotídeos. A sequência do RNAr 16S apresenta uma similaridade genômica acima do nível de espécie permitindo comparações por todo o reino bacteriano.

Espécies bacterianas estreitamente relacionadas frequentemente têm sequências RNAr 16S idênticas.

Essa técnica, portanto, fornece informações complementares à hibridização DNA-DNA. Determinações de sequências dos genes para o RNAr 16S são usadas na identificação no laboratório de microbiologia clínica.

Segundo Feitosa *et al.* (2008) a presença de bactérias da família *Enterobacteriaceae* nas mãos, jalecos de enfermeiros, em superfícies, utensílios em geral e instrumentais hospitalares, comprova a presença de microrganismos nos

diversos lugares e o risco de infecções principalmente hospitalares, conseqüentemente para uma minimização destas infecções é necessário a implementação de boas práticas de higienização das mãos.

A higienização das mãos dos manipuladores e o local onde as frutas e verduras ficam armazenadas apresentam microrganismos que podem trazer malefícios para os seres humanos, portanto, vê-se a necessidade de incorporar no dia-a-dia dos hortifrutigranjeiros boas práticas de higienização das mãos e das bancadas onde estes alimentos ficam expostos com uma solução de álcool-própolis a fim de minimizar ou retardar o crescimento bacteriano.

Um estudo realizado por Corrêa (2007) onde verificou-se a ação do extrato de própolis em *Staphylococcus aureus* comprovou que a própolis verde, conhecida como sendo a mais eficiente no controle microbiano, em baixas concentrações fora eficaz para retardar o crescimento bacteriano. Apesar das bactérias gram-positivas não serem a principal causadora das infecções hospitalares, elas estão presentes em abundância no ambiente e podem contribuir para novas infecções.

Segundo estudo realizado por Castro *et al.* (2007) a sazonalidade e o período da coleta influenciam na atividade antimicrobiana, devido, principalmente, a concentração de bioativos provenientes das diferentes fontes vegetais da própolis.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS

5.4.1 Quantificação do teor de flavonóides totais

Foram utilizados os mesmos testes realizados por Funari e Ferro (2006) e Hunbinger (2009), para quantificação dos flavonóides totais presentes nos diferentes extratos da própolis utilizada neste estudo.

A curva representada pela Figura 6 foi construída a partir dos valores obtidos de absorbância da solução padrão de quercetina, em diferentes concentrações. Através desta curva é possível obter a relação entre o valor de absorbância em 425 nm, da solução de quercetina com concentração de flavonóides na origem natural.

O valor de r^2 na Equação (1) demonstra o coeficiente de determinação da regressão linear. Quanto mais próximo de 1 estiver este valor, mais perto da perfeição estará a regressão linear.

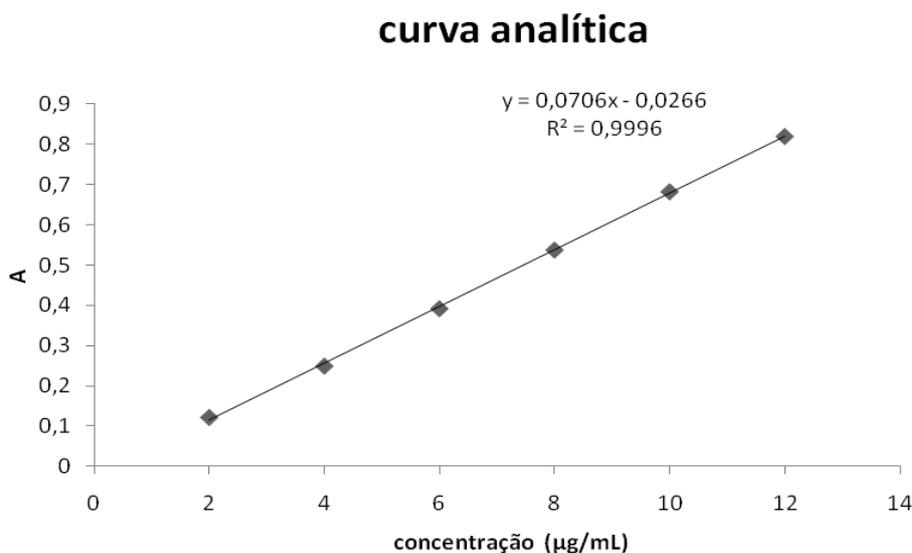


Figura 6. Gráfico de absorbância da solução padrão de quercetina. $y = 0,0706x - 0,0266$ (1).

A partir da equação obtida pode-se calcular o teor de flavonóides dos diferentes extratos de própolis alecrim-do-campo a partir da absorbância em 425 nm (FUNARI E FERRO, 2006; HUBINGER, 2009).

Os valores de absorvância foram aplicados na equação substituindo o valor de y e obteve-se o valor de x , sendo a concentração em $\mu\text{g/mL}$. Esta concentração foi multiplicada por 1250 (fator de diluição) para obter o valor de miligramas de flavonóides por grama de extrato (HUBINGER, 2009).

O teor de flavonóides da primeira extração está apresentado na Tabela 8 e o teor de flavonóides da segunda extração na Tabela 9.

Tabela 8. Quantificação flavonóides 1^a extração

Teor flavonóides 1^a extração	
Extração álcool 70%	47,90 $\mu\text{g/mg}$
Extração álcool 90%	41,37 $\mu\text{g/mg}$
Extração álcool PA	48,77 $\mu\text{g/mg}$

Castro *et al.* (2007) realizaram a quantificação em solução de quercetina diluída em álcool 80%, segundo ele o espectro de absorção de UV é um dos parâmetros físico-químicos mais usado para analisar própolis, pois seus principais compostos são ácidos fenólicos, flavonóides entre outros os quais absorvem nesta região ultravioleta.

Os extratos testados da 1^a extração apresentaram taxas efetivas de flavonóides totais, onde foi possível obter 47,90 $\mu\text{g/mg}$ em álcool 70% e 48,77 $\mu\text{g/mg}$ álcool PA. O extrato em álcool 90% apresentou um valor de 41,37 $\mu\text{g/mg}$ de flavonóides, um valor menor quando comparados com os extratos anteriores, porém significativo. Apesar de eficiente, este extrato não pode ser adicionado em meio líquido, uma vez que a sua adição turva o meio impedindo sua leitura no UV-Vísivel, por isso, outros métodos devem ser realizados para testar sua eficiência no crescimento bacteriano.

Na quantificação dos flavonóides da 2^a extração, apresentados na Tabela 9, os resultados foram baixos quando comparados com a extração anterior.

Tabela 9. Quantificação flavonóides 2ª extração

Teor flavonóides 2ª extração	
Extração álcool 60%	11,30 µg/mg
Extração álcool 70%	9,35 µg/mg
Extração álcool 90%	8,40 µg/mg
Extração álcool PA	6,26 µg/mg

As taxas de flavonóides totais foram relativamente baixas, porém estes extratos não apresentam restrições ao serem testados, podem ser adicionados em meio de cultura líquido que não modificam as propriedades do mesmo e sua análise podem ser feita através do UV-Visível.

Os flavonóides são os responsáveis pela ação terapêutica, conforme os resultados apresentados na Tabela 9, estes extratos não são efetivos devido ao baixo teor de flavonóides.

Segundo Funari e Ferro (2006) o método usado para quantificar os flavonóides totais baseia-se na formação de complexos estáveis entre os cátions de alumínio e os flavonóides, ocorrendo durante sua leitura no espectrofotômetro de UV-Visível, um deslocamento para maiores comprimentos de onda, permitindo a quantificação dos flavonóides no extrato em estudo.

Após a quantificação dos flavonóides ambos foram testados com os isolados coletados para poder estabelecer uma ação da própolis estudada.

5.5 Teste de difusão em disco

Os extratos analisados quanto ao teor de flavonóides foram testados nos isolados bacterianos apresentados anteriormente. O ensaio de difusão em disco foi escolhido como ensaio teste uma vez que é fácil e rápida execução apresentando boa reprodutibilidade.

Os resultados dos ensaios de disco difusão realizados com a 1ª extração da própolis estão apresentados na Tabela 10, com a 2ª extração na Tabela 11 e apenas com álcool PA na Tabela 12.

Tabela 10. Halo de inibição 1ª extração da própolis (- os traços indicaram que não apresentaram halo de inibição).

Nº microrganismo	Concentração Própolis	Halo em mm					
		Álcool 70%		Álcool 90%		Álcool PA	
25	0,001 g/mL	-	-	3,35	4,72	4,21	4,13
26		-	-	5,13	5,08	3,81	4,98
33		-	-	5,72	6,21	3,95	4,80
36		4,22	4,15	4,80	6,20	4,53	4,13
37		-	-	4,30	4,92	5,89	4,92
25	0,002 g/mL	4,04	4,98	4,54	4,55	-	-
26		-	-	3,89	3,99	4,00	3,66
33		-	-	4,43	4,37	4,48	4,28
36		4,84	3,78	4,91	4,35	5,31	5,09
37		-	-	4,00	4,00	4,67	4,36

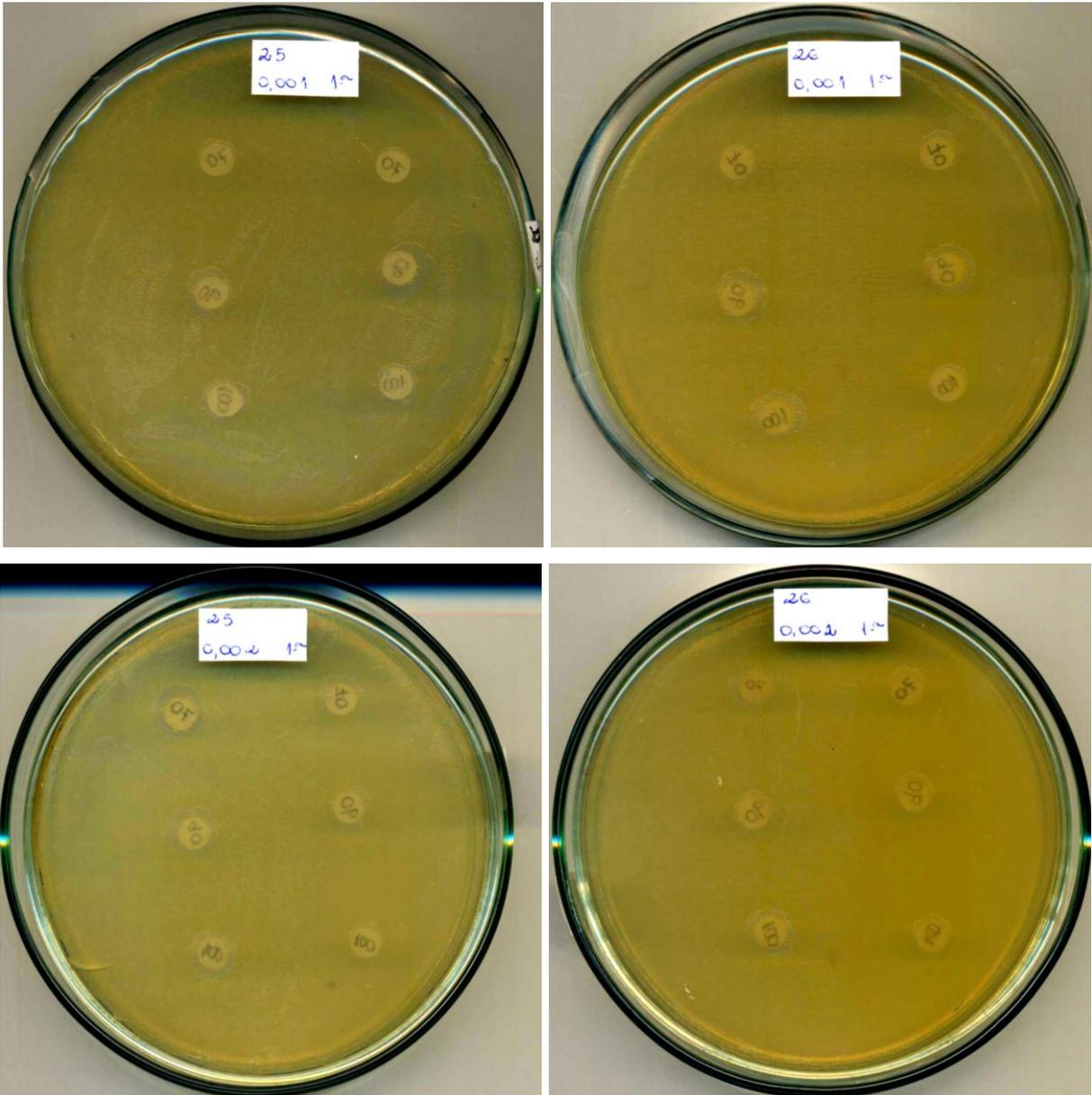


Figura 7. Exemplos de halos de inibição de alguns isolados em concentrações diferentes de própolis na 1ª extração.

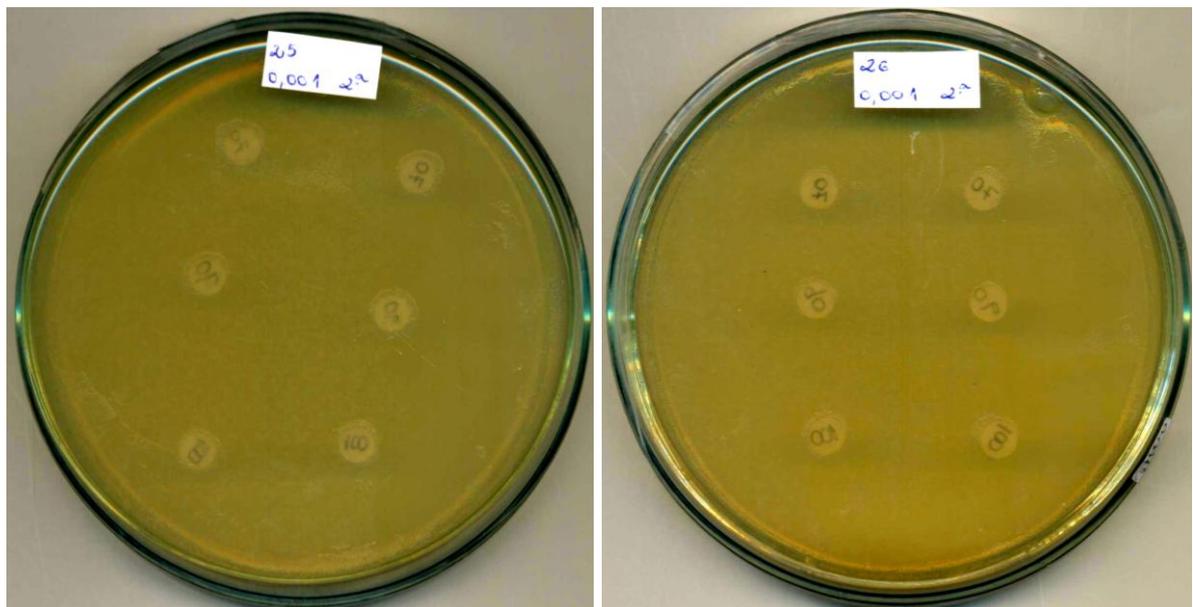
Apesar do uso do álcool 70% como anti-séptico, para as duas concentrações testadas na 1ª extração em álcool 70%, ele não mostrou ser eficaz para os isolados estudados. Para as concentrações de 0,001 g/mL e 0,002 g/mL do extrato em álcool 90% todas as bactérias apresentaram halo de inibição, mostrando um efeito significativo.

No extrato em álcool PA para a concentração de 0,001 g/mL todas as bactérias apresentaram halo de inibição, já na concentração de 0,002 g/mL o

isolado 25 não sofre nenhum efeito da própolis, isto mostra um diferente comportamento entre os isolados, dificultando um protocolo que seja eficaz para todos os isolados em estudos.

Tabela 11. Halo de inibição 2ª extração da própolis (- os traços indicaram que não apresentaram halo de inibição).

Nº microrganismo	Concentração Própolis	Halo em mm					
		Álcool 70%		Álcool 90%		Álcool PA	
25	0,001 g/mL	4,75	4,76	4,35	4,07	4,05	3,93
26		-	-	-	-	3,99	3,80
33		4,58	-	4,76	4,11	-	5,02
36		4,07	4,08	3,98	4,29	4,60	4,18
37		-	-	-	3,93	4,33	4,36
25	0,002 g/mL	-	-	-	-	-	-
26		4,13	5,19	4,93	4,31	4,52	4,79
33		4,19	4,28	4,28	4,31	4,35	4,29
36		-	-	-	-	5,02	5,00
37		-	-	4,83	4,67	5,12	4,65



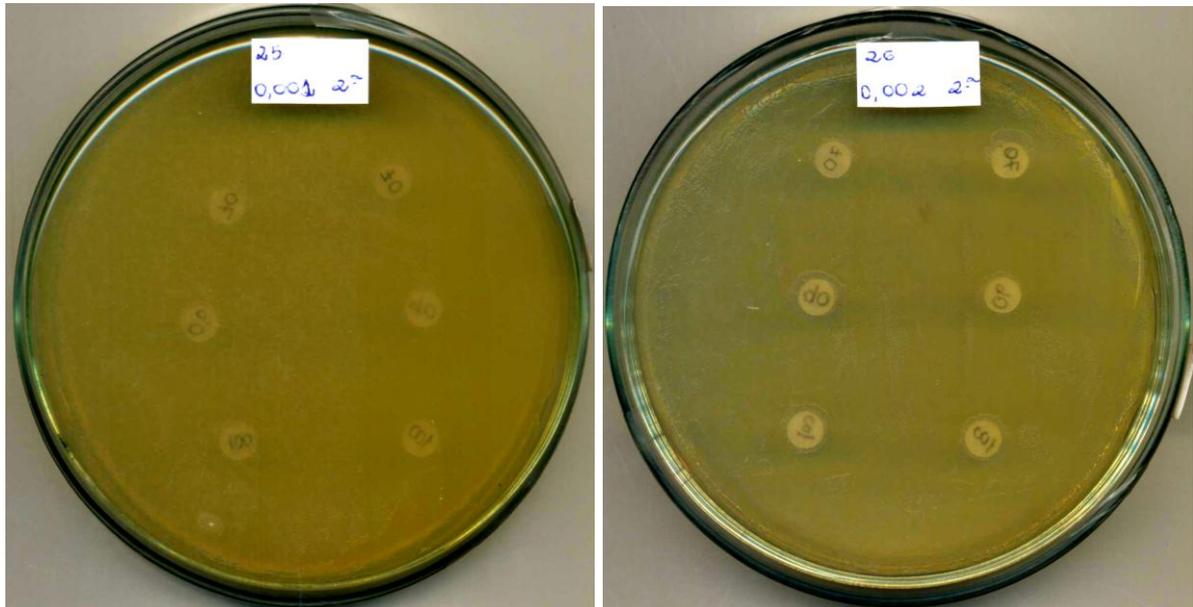


Figura 8. Exemplos de halos de inibição de alguns isolados em concentrações diferentes de própolis na 2ª extração.

Comparando com os resultados obtidos nos extratos da 1ª extração, os extratos da 2ª extração foram pouco efetiva quanto a formação de halos de inibição, devido o teor de flavonóides serem baixos como comprovado no teste de quantificação dos flavonóides.

Para as duas concentrações do extrato em álcool 70% poucos isolados apresentaram halo de inibição, mostrando que a própolis não interferiu no crescimento.

Para o extrato em álcool 90% ambas as concentrações mostraram-se eficazes impedindo o crescimento bacteriano dos isolados.

As concentrações em álcool PA foram significativas uma vez que quase todos os isolados apresentaram halo de inibição, ou seja, a própolis interferiu no crescimento bacteriano.

Tabela 12. Halo de inibição álcool PA

Nº microrganismo	Halo em mm					
	Álcool 70%		Álcool 90%		Álcool PA	
25	-	-	-	-	4,01	4,13
26	-	-	-	4,19	4,99	5,00
33	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-

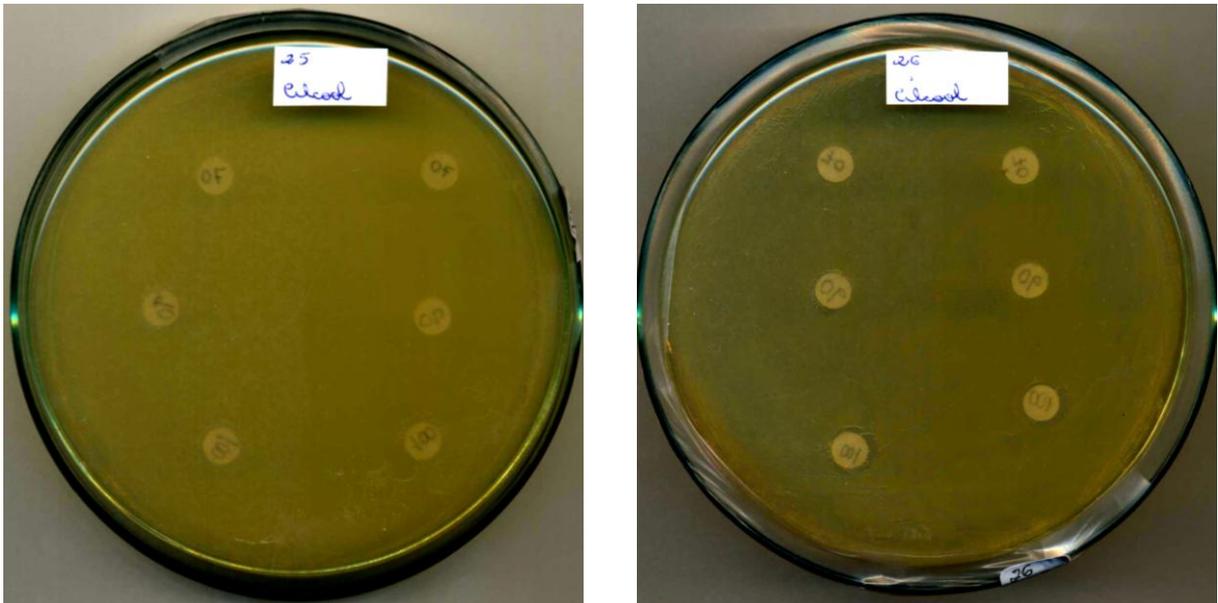


Figura 9. Exemplos de halos de inibição de alguns isolados em concentrações diferentes de álcool.

Os testes apenas com o álcool 70%, álcool 90% e o álcool PA mostraram que não são efetivos, pois não interferiram no crescimento microbiano, comprovando que o álcool não interferiu nos resultados obtidos pelos extratos.

O álcool 70% apresenta uma ação anti-séptica eficaz apenas na aplicação em superfícies, na pele, em instrumentos em geral; pois atua na destruição dos microrganismos, desnaturando suas proteínas, e também na lise da camada lipídica.

Quando a solução de álcool 70% é adicionada em qualquer meio líquido altera suas concentrações deixando de ser anti-séptica.

Nos resultados obtidos por Endler *et al.* (2003) para ambos os extratos alcoólicos de própolis houve presença de halo de inibição apenas para a bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) já para a *Escherichia coli* (Gram-negativa) mostrou-se resistente a solução de própolis não ocorrendo formação de halos. Testes foram realizados apenas com o álcool nas mesmas concentrações da própolis, não apresentando halos de inibição isto corrobora que o álcool não possui eficiência sem a própolis.

Existem diferentes espécies de bactérias presentes em um mesmo gênero, e o comportamento entre elas também podem ser diferentes, ou seja, uma ser mais susceptível à ação da própolis que a outra.

O extrato em álcool 90% da 1ª extração apresentou um efeito bactericida visto que quase todos os isolados estudados apresentaram halo de inibição, mostrando de um modo geral o efeito terapêutico da própolis, isto comprova os resultados obtidos na quantificação de flavonóides totais, onde o extrato em álcool 90% da 1ª extração apresentou uma taxa elevada de flavonóides.

Os extratos da 1ª extração mostraram um resultado eficaz quando comparado com os extratos da 2ª extração, isto foi comprovado devido ao baixo teor de flavonóides responsável pela ação terapêutica, uma vez que segundo Bianchini e Bedendo (1998) a ação antibacteriana da própolis está associada ao seu alto conteúdo de flavonóides.

Apesar do alto conteúdo de flavonóides da 1ª extração não foi possível testá-los em meio líquido, portanto, não foi possível estudar sua ação utilizando a curva de crescimento bacteriano uma vez que ao colocar o extrato em contato com a água o meio fica turvo impedindo sua leitura no espectrofômetro UV-Vísivel.

Com os resultados obtidos por Barbosa *et al.* (2009) foi concluído que dos 162 isolados bacterianos (81 gram-positivos e 81 gram-negativos) 92,6% dos isolados gram-positivos apresentaram sensibilidade ao extrato de própolis, enquanto 42,5% dos isolados gram-negativos apresentaram sensibilidade, garantindo que a ação sobre os isolados gram-negativos é restrita; conforme estudo de Gonsales *et al.* (2006) onde o ensaio de disco-difusão mostrou que a ação antibacteriana da própolis foi efetiva apenas para a bactéria gram-positiva.

5.6 Curva de crescimento dos isolados na presença de própolis da 2ª extração

Os extratos analisados quanto ao teor de flavonóides também foram testados nos isolados bacterianos através da avaliação da curva de crescimento microbiano. Porém, para esse ensaio somente o extrato da 2ª extração foi avaliado porque o extrato da 1ª extração alterou as propriedades do meio de cultura TSA, como já justificado na seção de material e métodos.

Os gráficos abaixo foram apresentados as sete concentrações onde o álcool não interferiu nos resultados, já as concentrações de 3 mg/mL e 4 mg/mL não estão apresentados, pois com a presença ou sem a presença do própolis os resultados foram os mesmos, mostrando que a ação bactericida era do álcool.

5.6.1 Curva de crescimento do isolado 25

Na Figura 10 são apresentadas as curvas de crescimento do isolado 25 em diferentes concentrações, nas quais não apresentou qualquer efeito bactericida ou bacteriostático.

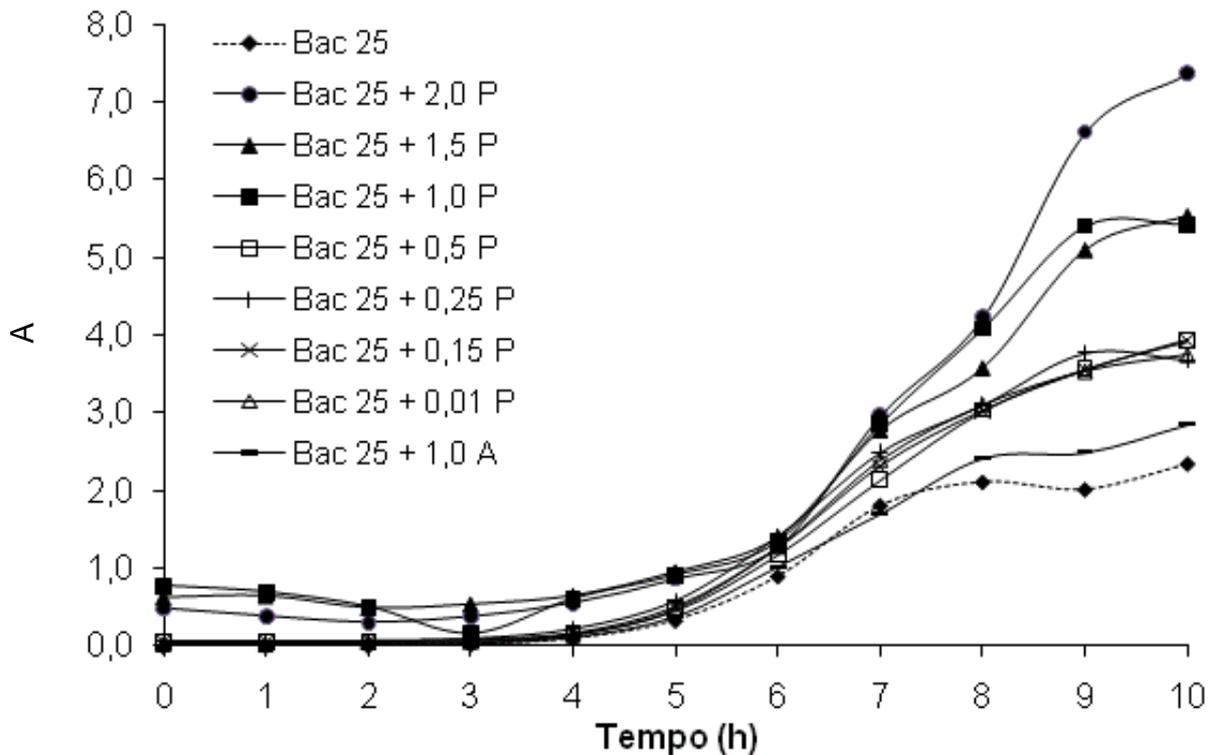


Figura 10. Curva de crescimento do isolado 25. As concentrações listadas na legenda da figura estão em ordem decrescente das concentrações em própolis sendo 2 mg/mL; 1,5 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,15 mg/mL, 0,01 mg/mL e 1 mg/mL em álcool.

Pela Figura 10, verificou-se que quanto maior a concentração de própolis, maior foi o crescimento do isolado. Porém a concentração em álcool 70% foi semelhante ao controle, confirmando que o efeito positivo da própolis não está relacionado com o álcool 70%. Estes resultados permitem levantar a hipótese de que neste caso a própolis foi utilizada como nutriente para o crescimento bacteriano.

5.6.2 Curva de crescimento do isolado 26

Na Figura 11 são apresentadas as curvas de crescimento do isolado 26 em diferentes concentrações, onde em ambas não apresentou nenhum efeito bactericida ou bacteriostático.

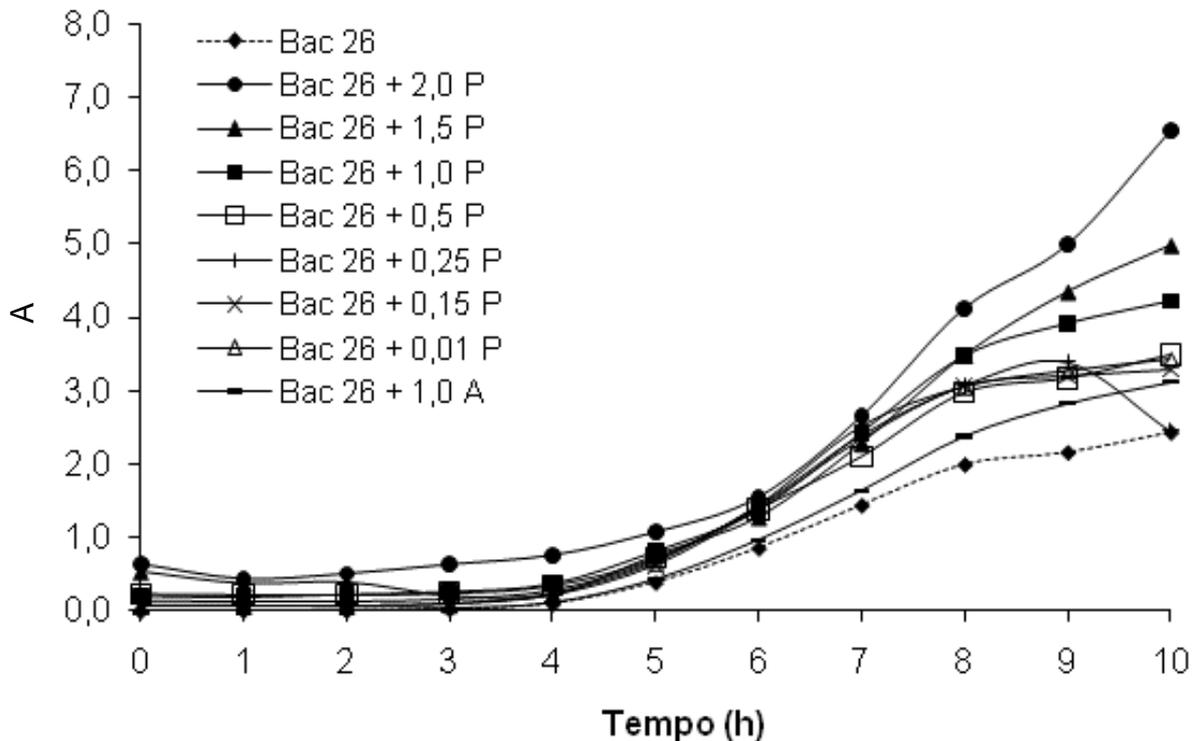


Figura 11. Curva de crescimento do isolado 26. As concentrações listadas na legenda da figura estão em ordem decrescente das concentrações em própolis sendo 2 mg/mL; 1,5 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,15 mg/mL, 0,01 mg/mL e 1 mg/mL em álcool.

Na Figura 11, observou-se que as concentrações de própolis não indicaram um efeito bactericida ou bacteriostático quando comparado com a curva de crescimento do controle. Assim como no isolado 25, a concentração de etanol 70% não apresentou nenhum efeito quando comparada com o controle da bactéria, isso comprova que o álcool 70% não interfere no efeito do extrato. O etanol 70% tem ação bactericida quando usado para limpeza de superfícies, como na mão, instrumentação cirúrgica, banca de laboratórios.

5.6.3 Curva de crescimento do isolado 33

Na Figura 12 são apresentadas as curvas de crescimento do isolado 33 em diferentes concentrações, onde nenhuma das concentrações apresentaram nenhum efeito da ação terapêutica da própolis.

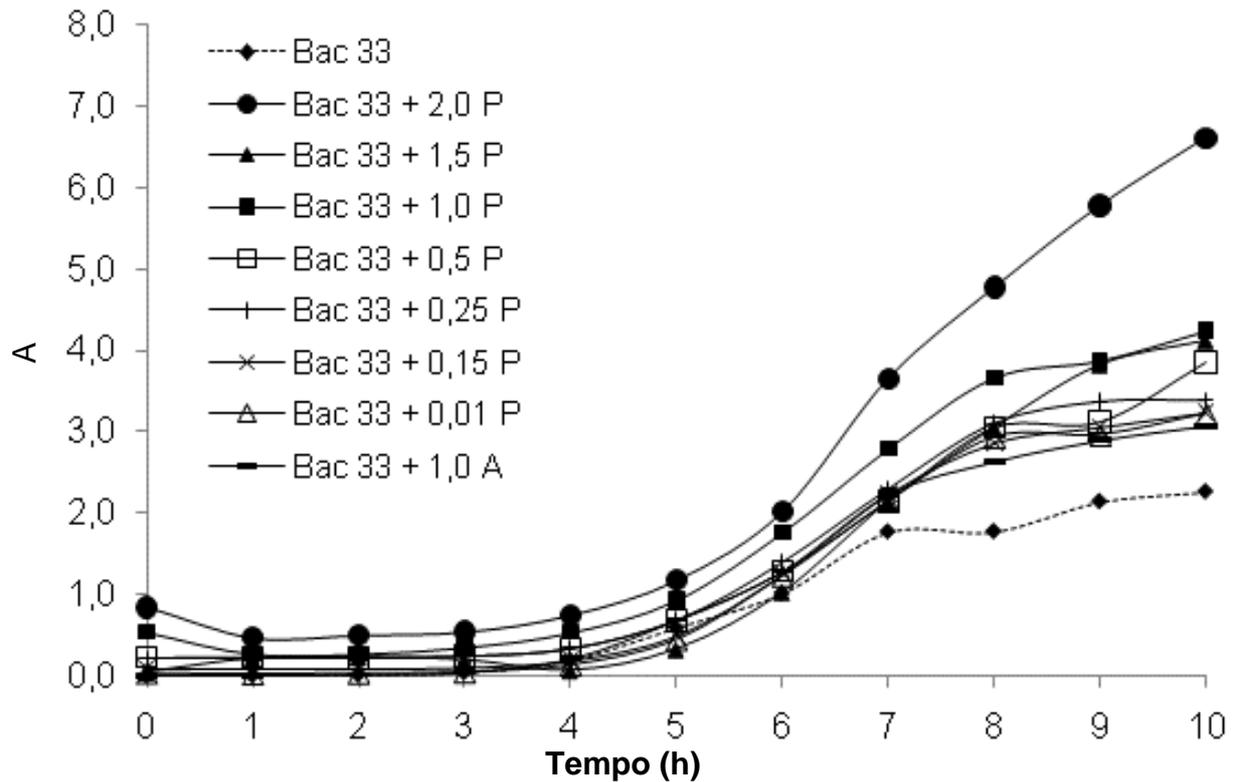


Figura 12. Curva de crescimento do isolado 33. As concentrações listadas na legenda da figura estão em ordem decrescente das concentrações em própolis sendo 2 mg/mL; 1,5 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,15 mg/mL, 0,01 mg/mL e 1 mg/mL em álcool.

Para o isolado 33 todas as concentrações de própolis apresentaram curva de crescimento maior que a curva de crescimento controle, apenas com o isolado sem o extrato de própolis. Mais uma vez isto é um indicativo de que a própolis foi utilizada como nutriente para o crescimento bacteriano.

5.6.4 Curva de crescimento do isolado 36

Na Figura 13 são apresentados as curvas de crescimento do isolado 33 em diferentes concentrações, onde nenhuma das concentrações apresentaram uma ação bactericida ou bacteriostático do extrato de própolis.

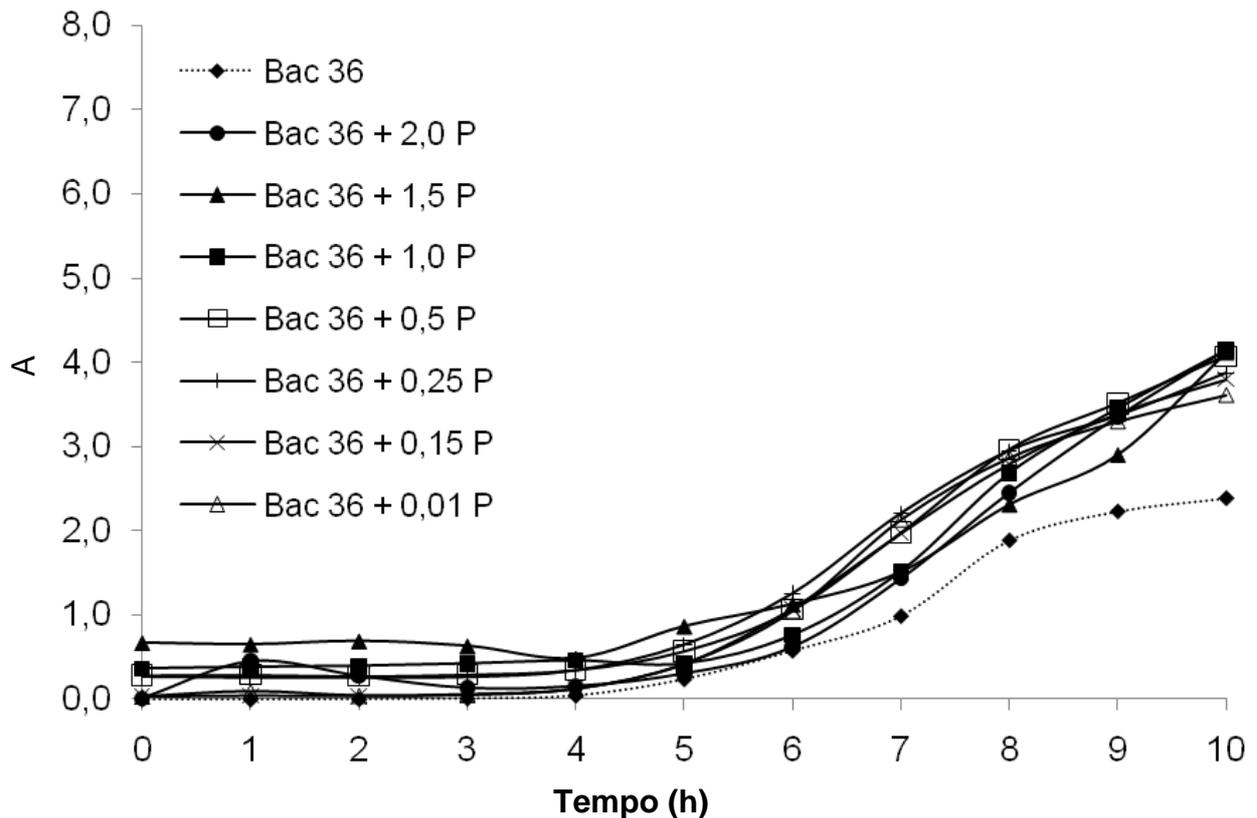


Figura 13. Curva de crescimento do isolado 36. As concentrações listadas na legenda da figura estão em ordem decrescente das concentrações em própolis sendo 2 mg/mL; 1,5 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,15 mg/mL, 0,01 mg/mL e 1 mg/mL em álcool.

Conforme Figura 13 nenhuma das sete concentrações testadas da própolis apresentaram um efeito bactericida ou bacteriostático quando comparado com o controle do isolado 36. Resultado semelhante aos outros isolados.

5.6.5 Curva de crescimento do isolado 37

Na Figura 14 são apresentados as curvas de crescimento do isolado 26 em diferentes concentrações, onde em ambas não apresentou nenhum efeito bactericida ou bacteriostático.

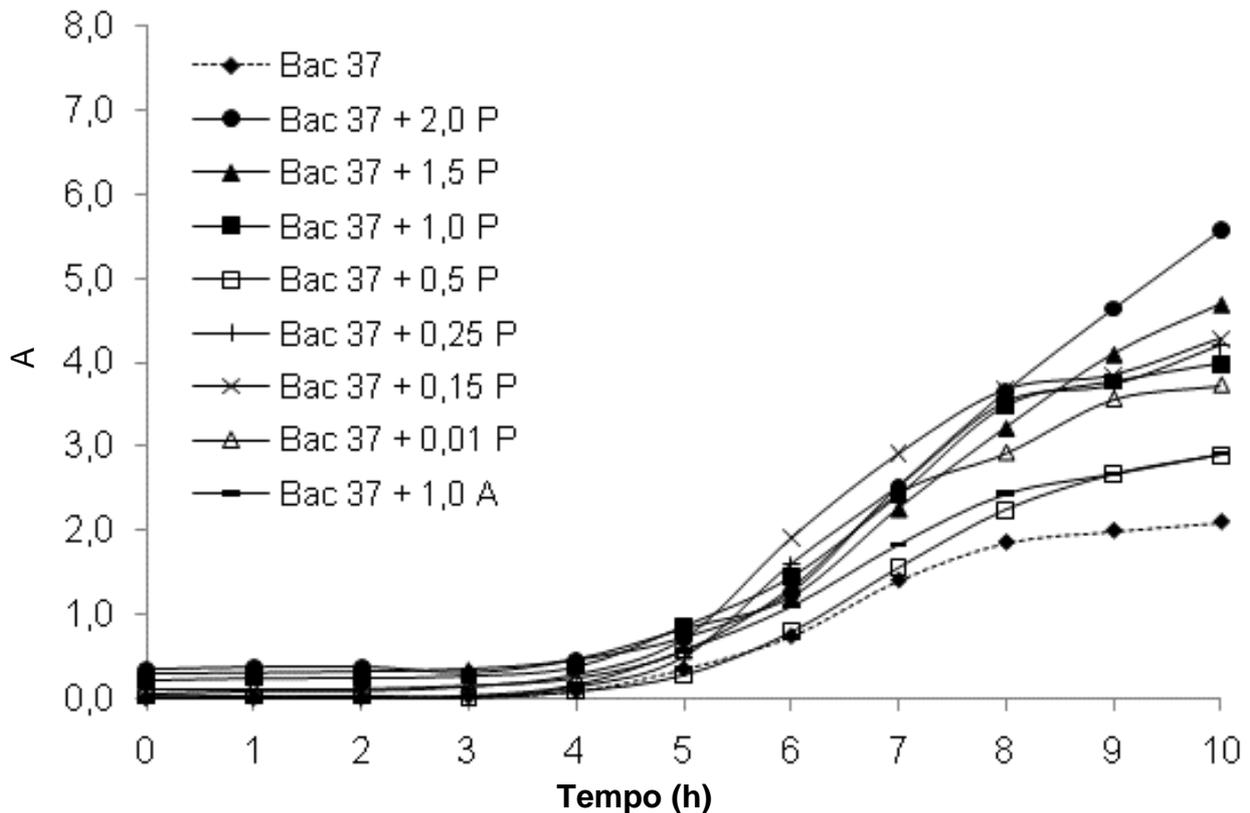


Figura 14. Curva de crescimento do isolado 37. As concentrações listadas na legenda da figura estão em ordem decrescente das concentrações em própolis sendo 2 mg/mL; 1,5 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,15 mg/mL, 0,01 mg/mL e 1 mg/mL em álcool.

Para o isolado 37 o comportamento diante das sete concentrações de própolis testadas foi semelhante aos isolados 25, 26, 33 e 36 onde nenhuma das concentrações apresentou um efeito antimicrobiano, assim como a concentração de álcool 70%.

Segundo Pelczar *et al.* (1997) um ótimo crescimento microbiano requer uma combinação de nutrientes apropriados e uma condição física excelente, já para a eliminação ou diminuição do crescimento microbiano é necessário o uso de algum

agente químico ou físico, neste caso usou-se um agente químico natural, a própolis, a fim de atuar no crescimento microbiano, porém as condições do meio estavam favoráveis para um ótimo crescimento microbiano, onde nenhum dos isolados sofreram interferência no crescimento microbiano.

Os resultados apresentados das curvas de crescimento dos isolados acima justificam a afirmação de Gonsales *et al.* (2006), que a própolis tem ação antibacteriana para a bactéria gram-positiva, já para as bactérias gram-negativas sua ação é restrita.

Apesar das ações terapêuticas da própolis, ela apresenta maior eficácia nas bactérias gram-positivas do que nas bactérias gram-negativas, até hoje não existem comprovações que expliquem este comportamento, mas acredita-se que pelo fato da parede celular das bactérias gram-negativas serem mais complexas e apresentarem uma camada lipídica mais espessa pode-se explicar sua resistência aos extratos de própolis (Lutosa *et al.*, 2008).

Acredita-se que o que passa pelos poros das paredes celulares são as substâncias que favorecem o crescimento das bactérias, pois verificou-se que quanto maior a concentração de própolis, maior a taxa de crescimento o que é evidenciado pela alteração na inclinação da curva de crescimento quando comparada uma com as outras.

Lutosa *et al.* (2008) afirma que muitos estudos devem ser feitos para correlacionar a ação terapêutica da própolis com sua composição química para assim criar um protocolo eficaz para as bactérias de um modo geral.

Segundo Castro *et al.* (2007) a sazonalidade e o período da coleta influenciam na atividade antimicrobiana, devido a concentração de bioativos provenientes das diferentes fontes vegetais da própolis, por isso, a própolis necessita-se ser melhor explorada em termos químicos, modo de extração, solvente usado para extração, para depois ser aplicada.

6 Conclusão

Uma grande diversidade de bactérias foi isolada de frutas e verduras no ambiente de comercialização, foi possível isolar 46 amostras de bactérias, entre elas bactérias gram-positivas e gram-negativas, por isso, a necessidade de higienização das frutas e verduras.

Dos 13 bacilos gram-negativos, os 5 isolados escolhidos aleatoriamente foram identificados como sendo da família *Enterobacteriaceae* sendo três isolados do gênero *Escherichia sp.* e dois isolados do gênero *Enterobacter sp.*

Através da quantificação do teor de flavonóides totais das diferentes extrações realizadas em álcool 70%, 90% e PA na 1ª extração, foi possível verificar que há maior quantidade de flavonóides em geral na 1ª extração. Para as concentrações extraídas da 1ª extração o efeito sobre o crescimento microbiano dos isolados identificados foram eficaz, os halos de inibição presentes na maioria dos isolados comprovam que o extrato interferiu no crescimento microbiano.

Os extratos da 2ª extração em álcool 60%, 70%, 90% e PA, apresentaram um baixo índice de flavonóides e o extrato de própolis em álcool 70% não apresentaram efeito bactericida ou bacteriostático sobre os isolados testados.

Os resultados apresentados nos gráficos referentes as diferentes concentrações de extrato de própolis da 2ª extração, mostram que a medida que as concentrações do extrato aumentam o crescimento bacteriano também aumenta indicando que na 2ª extração o produto possui mais nutrientes, uma vez que o teor de flavonóides é baixo. Já na 1ª extração o teor de flavonóides é alto e causando ação efetiva na inibição do crescimento bacteriano.

Os diferentes extratos foram testados, com intuito de desenvolver uma solução à base de própolis para incorporar no processo de pós-colheita, promovendo um saneamento no processo de manuseio e comercialização dos alimentos. Buscou-se utilizar concentrações mínimas para minimizar quaisquer alterações de sabor e aroma, uma vez que a própolis possui sabor e cheiro marcantes.

Através dos resultados verificou-se que os extratos da 1ª extração apresentaram um alto teor de flavonóides, substância responsável pela ação terapêutica, com isso, propõe-se um ponto de partida para um futuro estudo de

viabilidade de aplicação destes extratos na cadeia produtiva de hortifrutigranjeiros. Soluções de própolis da 1ª extração em álcool 90% nas concentrações 0,001 g/mL e 0,002 g/mL foram eficientes para os isolados identificados, pois todos os isolados apresentaram halo de inibição nas concentrações de própolis testadas, mostrando uma ação significativa. Estes extratos podem ser usados como coadjuvante para higienização das mãos, das frutas e verduras e bancadas onde estes estão expostos.

Várias pesquisas estão sendo realizadas nestes últimos anos, mas a própolis precisa ser pradonizada quimicamente para garantir sua qualidade, eficácia e segurança quanto as suas ações terapêuticas.

Referências

ALENCAR, Severino Matias de; AGUIAR, Cláudio Lima de; GUZMÁN, Julio Paredes; PARK, Yong Kun. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

ALMEIDA, Rogeria Comastri de Castro; KUAYE, Arnaldo Yoshiteru; SERRANO, Antônio de Melo and ALMEIDA, Paulo Fernando de. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**. São Paulo, p. 290-294, 1995.

AMBIENTE BRASIL. **Produto orgânico**. 2000. Disponível em: <<http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/produtosorg.html>>. Acesso em 16 abr. 2010.

BALBANI, Aracy P. S.; BUTUGAN, Ossamu Contaminação biológica dos alimentos. **Revista Pediatria**. Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.

BARBOSA, Maria Helena; ZUFFI, Fernanda Bonato; MARUXO, Harriet Bárbara; JORGE, Livia Loamí Ruyz. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista Enfermagem**. UNIFESP. São Paulo, p. 318-322, 2009.

BATISTA, Charles L. G; MELO, Gildevânia C. de; BARBOSA, Tâmara G. A; SANTANA, Willma J; Souza, Luciana B. S. de; COUTINHO, Henrique Douglas M. Epidemiologia molecular do Gênero *Arcobacter*. **Revista Arquivos de Ciência Saúde UNIPAR**. Umuarama, Mai/ago, 2004.

BIANCHINI, Luciana; BEDENDO, Ivan P. Efeito Antibiótico da própolis sobre bactéria fitopatogênica. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 149-152, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Decreto-Lei nº986 – de 21 de Outubro de 1969**. 2005. Disponível no site: <http://www.anvisa.gov.br/legis/consolidada/decreto-lei_986_69.pdf>. Acesso em 16 abr. 2010.

CASTRO, Myrella L.; CURY, Jaime A.; ROSALEN, Pedro L. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na atividade antimicrobiana e composição fenólica. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CORRÊA, Tassiane R. A; FABIANO, Melina Z. **Análise da própolis como elemento inibidor do crescimento de bactéria *Staphylococcus aureus***. Trabalho de Iniciação Científica. Embrapa Instrumentação Agropecuária. São Carlos, 2007.

DUARTE, Maria de Lourdes D. **Sistema de Produção Online: Sistema de Produção da Pimenteira-do-reino**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, 2005.

Escola Secundária Dr. Jaime Magalhães Lima. Programa Prof2000. Núcleo de estágio de Biologia e Geologia 2002/2003. **Técnica de coloração de Gram**. Disponível em: <www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm>. Acessado em 02 fev. 2010.

ENDLER Alexandra L; OLIVEIRA, Susana C.; AMORIM, Cristiane A.; CARVALHO, Michelle P.; PILEGGI, Marcos. Teste de eficácia da própolis no combate a bactérias patogênicas das vias respiratórias. **Revista UEPG Ciências Biológicas**. Ponta Grossa, p. 17-20, jun, 2003.

FEITOSA, Sarah Borges Feitosa; ARAÚJO, Robson Botelho de; COSTA, Patrícia Graziella Medeiros da; VIEIRA, Jéssica; OLIVEIRA, Monique Bárbara Rosa de; CARNEIRO, Lílian Carla. **Estudo de Enterobactérias no Hospital público de Morrinhos - GO**. Trabalho de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Góias. Out, 2008.

FORBES, Charles. D.; JACKSON, William. F. **Atlas colorido e texto de clínica médica**. 2. ed, p. 534. São Paulo: Manole, 1998.

FUNARI Cristiano S.; FERRO, Vicente O. Análise de própolis. **Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. Campinas, p. 171-178, jan/mar, 2006.

GADELHA, Janine Colares; INNECCO, Renato; ALCANFOR, Daisy Coutinho; MATTOS, Sérgio Horta; MEDEIROS Filho, Sebastião; VIEIRA, Aurilene Vasconcelos. Defensivos naturais no tratamento pós-colheita do pedúnculo de melão. **Revista Ciência Agronômica**. Ceará, v.34, n.1, 2003.

GONSALES G. Z.; ORSI R. O.; FERNANDES JÚNIOR A.; RODRIGUES P.; FUNARI S. R. C. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 276-284, 2006.

HALEBIAN, S.; HARRIS B.; FINEGOLD, S. M; ROLFE R. D. Rapid Method That Aids in Distinguishing Gram-Positive from Gram-Negative Anaerobic Bacteria. **Journal of clinical Microbiology**, California, v. 13, n. 3, p.444-448, 1981.

HOFFMANN, Fernando Leite. Fatores limitantes à proliferação de microrganismos em alimentos. **Revista Brasil Alimentos**, São José do Rio Preto: Unesp, n.9, 2001.

HUBINGER, Silviane Z. **Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosmético de ação antioxidante dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae Caesalpinioideae)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2009.

JAY, James M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed, p. 355 -383. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LUTOSA, Sarah R.; GALINDO, Alexandre B.; NUNES, Lívio C. C.; RANDAU, Karina P.; NETO, Pedro J. Rolim. Própolis: atualizações sobre a química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, p. 447-454, Jul/Set, 2008.

MORETTI, Paulo. E. **Microbiologia: Fundamentos e Aplicações**, 2008. Disponível em: <<http://www.fam.br/microrganismos>> Acesso em: 19 agosto de 2008.

NASCIMENTO, Evandro A.; CHANG, Roberto; MORAIS, Sérgio A. L.; VELOSO, Dorila P.; REIS, Débora C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 379-386, 2008.

OLIVEIRA, Ingergleice M.; JUNQUEIRA, Ana Maria R. **Aspectos da contaminação microbiológica em hortaliças**. Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Núcleo de Apoio à Competitividade e Sustentabilidade da Agricultura. Brasília, 2005.

PACKER, Janaina F.; LUZ, Marisa M. S. Método para avaliação da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

PARK, Yong Kun; IKEGAKI, Masaharu; ABREU, José A. da Silva; ALCICI, Nívia M. Freire. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 1-17, 1998.

PAULUS, Gervásio; MULLER, André M.; BARCELLOS, Luiz Antônio R. **Agroecologia aplicada: praticas e métodos para uma agricultura de base ecológica**. Porto Alegre: EMATER/RS, p. 86, 2000.

PEREIRA, Alberto dos S.; SEIXAS, Fernando R. M. S.; AQUINO NETO, Francisco R. de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PELCZAR J. R., Michael J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, Noel R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. Ed. Vol. 1. São Paulo: Makron Books, 1997.

PINTO, Antônio. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. **Revista Millenium**. Portugal, n. 4, p. 91-100, 1996.

Embrapa Informação Tecnológica. Programas de alimentos seguros. **Manual de boas práticas agrícolas e sistema APPCC**. p. 98 (Série Qualidade e Segurança dos Alimentos). Brasília/DF, 2004.

SANTOS, Adélia A. M. **Higienização das mãos no controle das infecções em serviços de saúde**. AGÊNCIA Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2004.

SEGABINAZI, Stefanie D.; FLÔRES, Maristela L.; BARCELOS, Aléverson da S.; JACOBSEN, Gislaine; ELTZ, Rosângela D. Bactérias da família *Enterobacteriaceae* em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. **Revista Acta Scientiae Veterinariae**. Rio Grande do Sul, p. 51-55, 2005.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES JUNIOR., A.; LOPES, C.A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Irlanda, v. 73, n. 1-2, p. 243-249, 2000.

SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N. A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, 2007.

SOUSA Cristiana P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, Juiz de Fora, v.9, n. 1, p. 83-88, jan-jun, 2006.

SOUZA, E.A.; INOUE, H.T.; GOMES, S.M.A.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Revista Archivos de Zootecnia**. Espanha, p. 571-576, 2010.

TORTORA, Gerard J. FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8. ed, p. 155-182. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, Luiz R.; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 5. ed. p. 7-29, 152-172, 271-279. São Paulo: Atheneu, 2008.

VILELA, Nirlene J.; HENZ, Gilmar P. Situação atual da participação das hortaliças no agronegócio brasileiro e perspectivas futuras. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 71-89, 2000.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. **Seção III - Metabolismo microbiano/Provas Bioquímicas**. Disponível em: <www.microbiologia.ufba.br/aulas/provas%20bioquimicas.doc>. Acesso em: 16 abr. 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. Departamento de Microbiologia. Instituto de Ciências Biológicas. **Procedimentos básicos em microbiologia: técnicas assépticas e cultivo de microrganismos**. Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/mic/mic/m-42.html>>. Acesso em: 16 mar. 2010.

ANEXOS

Sequenciamento do DNA dos isolados coletados no hortifrutigranjeiro

Isolado 25

GGCAGCTCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
AAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCC
CAGATGGGATTAGCTAGTTGGGGTAACGGCTCACCTCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACA
CTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCCATGCCGCTGGATCGGGTTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCGATGCGGTTAATAACCGTGACGCC
GGGAA

Isolado 25

GTCAGCTCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGG
AAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCC
CAGATGGGATTAGCTAGTTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT
GATGCAGCCATGCCGCTGTATTTCGGGTTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCGATGCGGTTAATAACCGTTGA
CGCCAGGAA

Isolado 26

GTACTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAA
CGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAG
ATGGGATTAGCTAGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
GCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCGATGCGGTTAATA
ACCGCGTCGATTGACGTTACCGAAGAACAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTCGGATGTGAAATCCCCGGGGGAATA

Isolado 26

GTACTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAA
CGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAG
ATGGGATTAGCTAGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCA
GCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCGATGCGGTTAATA
ACCGCGTCGATTGACGTTACCGAAGAACACGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGC
GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTCGGATGTGAAATCCCCGGGGGAATAC

Isolado 33

CGGCAGAGTCGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGG
GGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACGAGGGGGACCTTCGGGCCTCATCAGATG
TGCCAGATGGGATTAGCTAGGGGTAACGGCTCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCC
ACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT
GATGCAGCCATGCCGCTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGGCGGTTAATAAC
GATTAAAGCACACTCCGTGAGCAGGGGAGGGTGCAAAGGAAATCA

Isolado 33

CGGCAGAGTGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGG
 GATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGACGAGGGGGACCTTCGGGCCTCATCAGATGT
 GCCCAGATGGGATTAGCTAGGGGTAAACGGCTCACTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCA
 CACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTG
 ATGCAGCCATGCCGCGTGATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGGCGGTTAATAATC
 GATTAAGCACACTCCGTGAGCAGGGGAGGGTGCAAAGGAAATCA

Isolado 36

GCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGATGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
 AGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTA
 GCTAGTTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTG
 AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATG
 CCGCGTGATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCGATGCGGTTAATAACCGCG
 TATTGACAGAAACACCGGCTCTCCGAGCAGCCGGAGGGTGTGAATTACTGGGCGGGC

Isolado 36

GCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGATGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGT
 AGCTAATAACCGCATAACGTCGCAAGAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTA
 GCTAGTTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTG
 AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATG
 CCGCGTGATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGCCGATGCGGTTAATAACCGCG
 TATTGACGAGAAACACCGGCTCTCCGAGCAGCCGGAGGGTGAATTACTGGGCGGGC

Isolado 37

GCTGCTTCGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTA
 ATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTA
 GCTAGTTGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTG
 AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATG
 CCGCGTGATGAAGATCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGATGCGGTTAATAACGATTGACCGCTAACTC
 CGTGCCAGCAGTAGGTGCAAGCAAGCACTCCGGGCTAAC

Isolado 37

GCTGCTTCGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTA
 ATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCCAGATGGGATTA
 GCTAGGGGTAAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGA
 CACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCG
 CGTGATGAAGATCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGATGCGGTTAATAATCGATTGACACGCTAACTCCG
 TGCCAGCAGTAGGTGCAAGCAAGCACTCCGGCTCAAC