



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**MICROBIOTA ASSOCIADA A PRODUTOS
HORTÍCOLAS MINIMAMENTE
PROCESSADOS COMERCIALIZADOS EM
SUPERMERCADOS**

ODÍVIA OLIVEIRA ROSA

2002

53029

37524MF

ODÍVIA OLIVEIRA ROSA

**MICROBIOTA ASSOCIADA A
PRODUTOS HORTÍCOLAS
MINIMAMENTE PROCESSADOS
COMERCIALIZADOS EM
SUPERMERCADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora
Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Rosa, Odívia Oliveira

Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados
comercializados em supermercados / Odívia Oliveira Rosa. -- Lavras : UFLA,
2002.

202 p. : il.

Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Fresh-cut. 2. Produto hortícola – Minimamente processado. 3. Microbiota
vegetal. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. *Escherichia coli*. 6. *Bacillus cereus*. 7.
Listeria monocytogenes. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

- 664.807

DEDICATÓRIA

“Há pessoas que marcam certas épocas em nossa existência e precisam ser lembradas”.

Dr. Joaquim Pinto de Oliveira Neto

Dr. Lucas Bello

“Há aquelas que nos fazem felizes pelo simples fato de existirem”.

Rodolfo Rosa Alvarenga

Olivia Oliveira Rosa

Sandra Maria Chaves dos Santos

“Mas há aquelas que jamais serão esquecidas”.

Mario Augusto Oliveira Lemos (in memoriam)

Terezinha Bastos Alvarenga (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

“Todos nós precisamos de amor. O amor faz parte da natureza humana tanto quanto comer, beber, e dormir. Muitas vezes sentamos diante de um belo pôr-do-sol, completamente sós e pensamos:...

...Nada disto teria importância se não podessemos compartilhar todos os momentos com amigos como vocês!” (Paulo Coelho).

Aos professores, Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho, Dra. Maria Isabel Chitarra, Dra. Roberta H. Piccoli do Valle, Dr. Luiz Carlos O. de Lima, e Dr. Eduardo V. de B. Vilas Boas pela amizade, carinho e companheirismo.

Aos meus irmãos e irmãs, Olivar, Edilivia, Oliede, Eliana e Edgar, aos sobrinhos e sobrinhas, Nilo Augusto, Otavio Jr., Claudio, Aila, Sheila, Danielle, Fabiana, Ana, Natalia e Lais (in-memorian) pelo amor e carinho.

Aos colegas e amigos: Karla, Flavia, Ana Cristina, Keila, Eliane, Ivana, Ivany, Beto, Emília Cristina, Danielle, Adenilsdes, e em especial a Pedro Henrique pelo apoio e amizade.

Aos amigos e amigas: Carlão, Beto, Roberto, Paulo, Sergio, Valter, Lindaura, Lidinha, Yolanda, Marina, Maria Clara, Margarethe, Marilena, Tereza, Shirley e todos os membros da família Alvarenga. Obrigada pelo carinho de todos estes anos.

A Dra. Maria Lúcia Pereira (FUNED), Dr. Ernesto Hofer, Dra. Dália dos P. Rodrigues e Dr. Eliane Falaviana dos Santos (FIOCRUZ), sem o apoio dos quais este trabalho não teria sido realizado.

Ao Foto Wildes, em especial ao Cláudio, pela amizade e colaboração.

Meu eterno agradecimento

SUMÁRIO

Resumo geral.....	ii
General abstract.....	iii
Capítulo 1	1
1 Introdução.....	2
2 Referencial teórico	5
2.1 Ecologia microbiana das hortaliças	5
2.2 Microbiota epífita das hortaliças	6
2.3 Microbiota contaminante	11
2.4 Fatores que interferem na microbiota de produtos hortícolas minimamente processados.....	14
2.4.1 Efeito da temperatura de estocagem na microbiota	16
2.4.2. Efeito da atmosfera modificada	21
2.4.3 Efeito do pH	25
2.4.4 Efeito da umidade e atividade de água (aw).....	26
2.4.5 Efeito da manipulação e do processamento	28
2.4.6 Sistema de proteção natural	29
2.4.7 Teor de nutrientes.....	31
2.5 Patógenos em vegetais minimamente processados	32
2.5.1 <i>Escherichia coli</i>	32
2.5.2 <i>Salmonella</i>	43
2.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	50
2.5.4 <i>Bacillus cereus</i>	59
2.5.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	67
3 Referências bibliográficas.....	74
Capítulo 2	98
1 Resumo	99
2 Abstract.....	101
3 Introdução.....	102
4 Materiais e métodos	105
4.1 Coleta de amostras	105
4.2 Análises microbiológicas	106
5 Resultados e Discussões.....	107
6 Conclusões.....	130
7 Referências bibliográficas	131
Capítulo 3	137
1 Resumo	138
2 Abstract.....	139
3 Introdução.....	140
4 Materiais e métodos	142

4.1 Identificação de <i>Escherichia coli</i>	142
4.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.	142
5 Resultados e discussões	146
6 Conclusões.....	156
7 Referências bibliográficas.....	157
Capítulo 4	163
1 Resumo.....	164
2 Abstract.....	166
3 Introdução.....	167
4 Materiais e métodos	171
4.1 Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i>	172
4.2 Detecção de <i>Bacillus cereus</i>	173
4.3 Presença de <i>Listeria monocytogenes</i>	174
5 Resultados e discussões	176
5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	176
5.2 <i>Bacillus cereus</i>	182
5.3 <i>Listeria</i> sp.	187
6 Conclusões.....	192
7 Referências bibliográficas.....	194

RESUMO GERAL

ROSA, Odívia Oliveira **Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados**. 2002. 210p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, MG. O objetivo foi avaliar a microbiota presente em hortaliças minimamente processadas, durante a comercialização em supermercados, assim como elucidar a presença de patógenos e/ou suas toxinas. Para tal, foram determinadas as contagens globais de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas, coliformes totais e fecais, bolores e leveduras para estabelecer as condições sanitárias de obtenção, produção, manipulação, armazenamento, e comercialização desses produtos. Para avaliar os riscos de contaminação por patógenos, foram pesquisados *Staphylococcus aureus* enterotoxigênio, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*. As análises foram realizadas nas datas inicial e final de comercialização dos produtos, expressas nas embalagens. Verificou-se que as contagens iniciais para indicadores de manipulação e produção inadequadas foram bastante elevadas, indicando alto risco de deterioração dos produtos durante o período de comercialização. As contagens finais apresentaram-se elevadas quando comparadas aos índices iniciais para mesófilos, psicrotróficos, bolores e leveduras e coliformes fecais, que apresentaram taxas superiores a 1 a 2 log₁₀/g do produto em 41,18%, 76,5%, 41,2% e 27,3% das amostras, respectivamente. A detecção de *Salmonella Carrau* e *Escherichia coli* evidencia uma contaminação fecal perigosa, que pode ser oriunda da matéria-prima higienizada inadequadamente ou na linha de produção como consequência de contaminação ambiental, por utensílios e equipamentos ou, ainda, pela presença de portadores. A presença de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico tipo B (SEB) e a incidência de *Bacillus cereus* >10⁵UFC g⁻¹ em mais de 33% das amostras analisadas servem como indicação de alto risco de toxinfecção alimentar por esses produtos. O isolamento de *Listeria innocua sorovar 6a* reforça a suspeita de possível contaminação dos produtos por *Listeria monocytogenes*. Os resultados obtidos evidenciam uma contaminação fecal perigosa.

* Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho (UFLA)

GENERAL ABSTRACT

ROSA, Odívia Oliveira **The microbial flora associated of the fresh-cut products during the comercialization in supermarkets.** 2002. 210p. Thesis (Doctorate im Food Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

The experiment was conducted in the Microbiology Laboratory of the Food of Science Department at the Federal University of Lavras, MG, with the objective to evaluate the microbial flora present in fresh-cut vegetables during commercialization in supermarkets and to elucidate the presence of pathogens and/or toxins. For this, it was determined the total number of mesophilic and psychrotropic aerobic bacteria, fecal and total coliforms, mold and yeasts to establish hygienically obtainment condition, production, handling, storage and product commercialization. In order evaluate the hazards of contamination by pathogens, *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* were studied. Analyses performed at the initial and at the final date of product commercialization expressed on their packing, showed that initial counts for handling indicators and inadequate production were very high indicating high risk of deterioration during the period of commercialization. The final counts were high when compared with the initial indexes for mesophilic and psychrotropic aerobic bacteria, mold and yeast and fecal coliforms which presented values over $1-2 \log_{10}g^{-1}$ of the products in 41.18%, 76.5%, 41.2% and 27.3% samples, respectively. The detection of *Salmonella Carrau* and *Escherichia coli* show a dangerous fecal contamination which might originate from raw material inadequately hygienized or during production as a consequence of environmental contamination by utensils and equipments or by carriers presence. The presence of enterotoxigenic *Staphylococcae* B (SEB) and incidence of *Bacillus cereus* $>10^5$ UFCg⁻¹, in more than 33% samples are an indication of high risk of alimentary poisoning by these products. The isolation of *Listeria innocua* sorovar 6^a strengthens the suspicion of a possible product contamination by *Listeria monocytogenes*. The obtained results evidence a dangerous fecal contamination.

* Adviser: Eliana Pinheiro de Carvalho (UFLA)

CAPÍTULO 1

Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados

1 Introdução

A demanda de consumo por frutas e hortaliças, tanto frescas como parcialmente processadas, está associada à importância e influência na dieta para combate de várias doenças crônicas como as doenças coronarianas, obesidade e alguns tipos de câncer, associadas aos excessos alimentares ou dietas não balanceadas. Por outro lado, a conveniência da vida atual conduziu à produção de número amplo de produtos que são oferecidos para consumo imediato.

O reconhecimento da importância do consumo de vegetais, junto ao incremento da produção global de produtos frescos, associado ainda à mudança de comportamento do consumidor, contribuiu substancialmente para a produção de novos produtos vegetais frescos minimamente processados, despertando assim o interesse do consumidor. Os atributos positivos de um produto minimamente processado são a comodidade, a conveniência, a qualidade, e o seu estado ser parecido ao fresco.

Processamento mínimo é descrito, por vários autores, como o manuseio, preparação, empacotamento e distribuição de produtos agrícolas em estado fresco, (Shewfelt, 1987; Sarantópoulos, 1997; Chitarra, 1998). Produtos minimamente processados, também conhecidos como produtos levemente processados, parcialmente processados, processados frescos, cortados frescos ou pré-preparados, são aqueles que apresentam qualidade semelhante ao produto fresco, mas que sofreram alguma alteração da sua condição natural. Essa alteração pode incluir processos de corte, descaroçamento, descascamento, lavagem, fatiamento, acondicionamento e baixo nível de irradiação.

O conceito comercial de vegetais minimamente processados é aplicado para alface, agrião, rúcula e espinafre entre outras hortaliças de folha. Também cenoura, beterraba, couve-flor, brócolis, cebola, repolho etc., e suas combinações em saladas mistas, envolvendo operações que incluem: (1) pré-

seleção e lavagem para remoção de terra, insetos, produtos agroquímicos e matérias estranhas; (2) aplicação de agentes antimicrobianos (fungicida, cloro e outros sanificantes, ar ou água quente, etc.); (3) remoção de partes injuriadas; (4) remoção de partes não comestíveis (casca, caroço); (5) corte, fatiamento; (6) remoção da água de lavagem (centrifugação); (7) incorporação de aditivos para ajuste do pH (ácido ascórbico/cítrico), para controle microbiológico (benzoato de sódio, sorbato de potássio), controle de oxidação (ácido ascórbico, bissulfito, cisteína) e para modificação na textura (cálcio) (Sarantópoulos, 1997).

Normalmente são produtos crus, muito perecíveis e suas células estão metabolicamente ativas. Isso significa que processos biológicos, tais como respiração, amadurecimento e senescência, continuam se processando. A conservação pós-colheita de frutos e hortaliças requer processos tecnológicos avançados, que mantenham suas características sensoriais, evite perdas nutritivas e controle as reações fisiológicas e retarde ou iniba a ação da microbiota presente. O controle microbiológico dos produtos minimamente processados envolve fatores, como a qualidade da matéria-prima, condições de transporte, de processamento, de embalagem, de armazenamento e de comercialização.

O manuseio excessivo durante o descasque, o fracionamento, a lavagem, e as condições de aeração e embalagem possibilitam o aumento da microbiota e conseqüentemente o risco da presença de organismos patógenos transmissores de doenças ao consumidor. Isso ocorre porque as temperaturas de refrigeração e práticas de higiene e sanificação empregadas não são suficientes para retardar e/ou impedir a sua multiplicação, caso os processos empregados não sejam suficientes para elimina-los antes de embalados. Assim, o manejo sanitário correto, desde a coleta até a distribuição, é fundamental para evitar possível contaminação.

A falta de informação sobre a microbiota epífita dos produtos minimamente processados e o comportamento destes durante o armazenamento

e comercialização, assim como sobre os patógenos que possam estar presentes após o processamento, dificulta os estudos que subsidiem os processos tecnológicos para preservação e manutenção desses produtos durante o período de estocagem.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar as condições higiênico-sanitárias de produtos hortícolas minimamente processados durante a comercialização e estocagem sob refrigeração em supermercados. Também procurou elucidar a presença de uma microbiota patogena produtora de infecção e toxinfecção alimentar, destacando a presença de *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Listeria sp*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, como principais contaminantes oriundos da manipulação inadequada e técnicas perigosas de processamento e comercialização. Finalmente propôs-se a estabelecer o risco de toxinfecção alimentar pelo consumo destes produtos.

2 Referencial Teórico

2.1 Ecologia microbiana das hortaliças

As hortaliças são as partes comestíveis de uma planta, incluindo as folhas, talos, raízes, tubérculos, bulbos, flores e sementes (Müller, 1981; Sanlunkhe & Desai, 1984; ICMSF, 1985; Weichmann, 1987). São produtos perecíveis, com atividade metabólica durante o período pós-colheita.

Embora possuam pequeno valor nutritivo, pois seu teor em lipídios e proteínas, com exceção de algumas sementes, é menor quando comparado aos produtos animais, seu interesse na alimentação reside no seu teor em vitaminas e sais minerais, e nos fitonutrientes e fibras, de grande importância para a regulação do peristaltismo intestinal. Em geral, o pH dos tecidos encontra-se entre 5 a 7 e 0,60 a 0,87 de atividade de água (aw), oferecendo condições adequadas ao crescimento de numerosas espécies microbianas (Müller, 1981; Klein, 1987; Awad, 1993; Jay, 1994; Brecht, 1995).

Os produtos vegetais possuem uma microbiota natural superficial, cuja composição depende das condições do ambiente, particularmente da microbiota do ar, água e solo. Entretanto, o interior pode estar isento de germes, mas, com frequência, os microrganismos patogênicos podem invadir os tecidos vegetais durante a produção, elaboração, transformação e armazenamento. A falta de higiene pode ser apontada como a causa do desenvolvimento de microrganismos produtores de infecções e toxinfecções alimentares nestes produtos.

Assim, o aumento ou redução da microbiota contaminante origina-se do contato com utensílios, equipamentos e manipuladores de alimentos, ou pela adição de ingredientes complementares. Como resultado da atividade microbiana, ocorrem diferentes transformações químicas e, às vezes, também físicas. Geralmente, essas transformações culminam na perda de qualidade, do sabor, da cor e da consistência e demais atributos de qualidade, podendo alterar

totalmente o alimento, inutilizando-o (Müller,1981; Ahvemainen, 1996).

A deterioração dos tecidos vegetais, decorrente da atividade microbiana vai depender de vários fatores, assim como da capacidade de invasão dos microrganismos presentes. A composição dos tecidos, pH, aw, potencial de oxirredução, além das condições ambientais são fatores determinantes do tipo de microrganismos e da velocidade de crescimento dos mesmos. Outro fator a ser destacado é o dano ao tecido durante a colheita, transporte, processamento e armazenamento. Esse dano pode determinar uma deterioração rápida do produto, uma vez que o escoamento dos nutrientes das células permitirá a invasão e crescimento rápido de microrganismos (Maxcy, 1982; Brachett, 1987a; King Jr. & Bolin, 1989).

Os produtos vegetais não são estéreis e a manipulação intensa pode reduzir sua vida útil. Assim, cuidados, como seleção do material cru, técnicas de produção adequadas, embalagem e conservação a baixas temperaturas, não só são modos de retardar a deterioração microbiana como de conservar sua cor original, aparência, turgidez e demais características organoléticas e higiênicas.

2.2 Microbiota epífita das hortaliças

De acordo com King Jr. & Bolin (1989), se os alimentos forem mantidos sob condições de baixa temperatura, primariamente a microbiota será constituída por bastonetes Gram negativos. Com o aumento da temperatura, a microbiota muda, predominando bactérias ácido-láticas Gram positivas. *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, bactérias ácido-láticas e pectinolíticas e, em alguns casos, cepas patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas sp*, *Salmonella sp* e *Yersinia enterocolitica* são citadas como microrganismos encontrados em hortaliças frescas, saladas de vegetais refrigeradas e vegetais crus embalados (Manzano et al. 1995).

Nos vegetais crus, os microrganismos predominantes são bactérias,

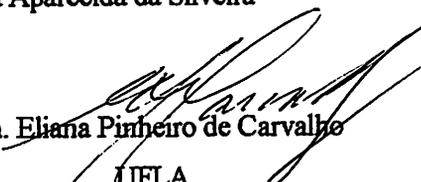
ODÍVIA OLIVEIRA ROSA

**MICROBIOTA ASSOCIADA A
PRODUTOS HORTÍCOLAS
MINIMAMENTE PROCESSADOS
COMERCIALIZADOS EM
SUPERMERCADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras com parte das exigências do Curso de Doutorado em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 04 de março de 2002.

Prof (a). Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle	UFLA
Prof. Dr. Luiz Carlos de Oliveira Lima	UFMG
Prof. Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas	UFLA
Prof (a). Dr. Ivana Aparecida da Silveira	UNILAVRAS


Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

embora taxas significativas de mofos e leveduras sejam detectadas. Junto às espécies microbianas ocasionais que se apresentam, encontram-se outras cuja área vital natural é a superfície das plantas, tais como os lactobacilos. As bactérias são especialmente freqüentes nas hortaliças cujo pH é neutro, enquanto que as leveduras preferem pH ácido e, por isso, são mais freqüentes nas frutas.

Embora a composição exata da microbiota inicial não possa ser antecipada, há uma microbiota característica presente. É possível, para quase todos os organismos, estarem presentes nos produtos vegetais. A microbiota primária epífita das hortaliças está formada, na sua maioria, por mofos dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Sclerotinia* e *Rhizoctonia*, (ICMSF, 1980; Müller, 1981). Porém, elas são em números inferiores às bactérias que geralmente estão constituídas por organismos saprófitos, como coliformes, corineformes, micrococos e *Pseudomonas* procedentes do solo, do ar ou da água, ICMSF (1985).

Contagens de 10^5 a 10^9 para mesófilos; <10 a 10^7 para coliformes; $<10^2$ a 10^8 para fungos filamentosos e leveduras, <10 a 10^9 bactérias ácido-láticas e 10^4 a 10^7 para a microbiota pectinolítica são destacadas por Nguyen-the & Carlin (1994). Inúmeros microrganismos, incluindo uma microbiota mesófila constituída por bactérias ácido-láticas e pectinolíticas, coliformes totais e fecais, leveduras e fungos filamentosos, são também destacados por Watada et al. (1996). Bactérias pectinolíticas, pseudomonas, enterobactérias e, em alguns casos, cepas patogênicas, foram descritas por Manzano et al. (1995). Os autores ressaltam que o tipo e a população diferem com o produto, prática de cultivo e grau de sanificação do produto. Muitas das bactérias isoladas de vegetais são pectinolíticas e podem causar degradação do tecido. Entre estas predominam *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas sp* fluorescentes (King Jr. & Bolin, 1989).

A versatilidade metabólica que permite que os microrganismos povoem todos os ambientes, juntamente com a disponibilidade de nutrientes destes

produtos, irá determinar o tipo e número de indivíduos.

Limites de contagens são fixados para populações microbianas em vegetais. Entre eles merecem destaque as especificações da regulamentação francesa, em que, para mesófilos aeróbios a 30°C, durante a fase de produção, são fixados índices de 5×10^6 UFC g⁻¹, e 5×10^7 UFC g⁻¹ na fase de consumo. Para coliformes fecais cultivados a 43,5°C, são estabelecidos padrões <1000 UFCg⁻¹, e ausência de *Salmonella sp.* No Brasil, a Portaria n° 451, de 19/09/1997, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS-MS), estabelecia no anexo I, item I, alínea "d", ausência de *Salmonella* e máximo de 2×10^2 NMP g⁻¹ de coliformes fecais para hortaliças frescas refrigeradas ou congeladas (Brasil, 1997). Em contrapartida, as especificações, para produtos vegetais prontos para o consumo, expressas no item XIX, alínea "d", estabelecia padrões de no máximo 5×10 NMP g⁻¹ de coliformes fecais e ausência de *Salmonella sp.* Para compatibilizar a legislação nacional com os regulamentos harmonizados no Mercosul, esta portaria foi revogada pelo artigo 4° da Resolução RDC n°12, de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001). Assim deu lugar aos padrões expressos no anexo I dos itens 2, 3 e 22, alínea "b", "a", e "d" para hortaliças, raízes e tubérculos e pratos prontos para o consumo a base de vegetais, respectivamente. Os padrões microbiológicos para hortaliças frescas passam a ser considerados somente para ausência de *Salmonella sp./25g*, e de 10^2 NMPg⁻¹ para coliformes a 45°C. Quanto às especificações para raízes, tubérculos e similares, são indicados padrões de 10^3 para coliformes a 45°C e ausência de *Salmonella sp./25g*. Podem ser verificados ainda padrões microbiológicos de 10^2 para coliformes a 45°C e ausência de *Salmonella sp./25g* para pratos prontos para o consumo à base de verduras e legumes crus, temperados ou não, com ou sem molho.

Nota-se que as novas determinações, embora tenham reduzido os índices aceitáveis para coliformes a 45°C, não apresentam especificações para patógenos toxígenos que possam originar-se das práticas de manuseio e

processamento durante obtenção dos produtos. Padrões para estafilococos coagulase positiva e *Bacillus cereus* só são indicados para produtos vegetais cozidos (item 22 alínea e) não constando em nenhum dos itens, especificações para fungos filamentosos e leveduras. Entretanto, observações são feitas em anexo quanto às situações de risco epidemiológico que justifiquem a realização de outras determinações não incluídas nos padrões estabelecidos pelo anexo I item 5.9.10 da RDC 12 (Brasil, 2001).

Embora não seja constatada a presença de patógenos ao homem e outros animais em hortaliças frescas, a não ser que estas sejam expostas a dejetos, vários autores citam o risco de contaminação durante a fertilização e irrigação, quando detectada a presença de dejetos humanos e animais. Isso ocorre porque estes irão contribuir com a presença de agentes etiológicos de diversas enfermidades infecto-contagiosas e parasitárias que normalmente estariam ausentes (Müller, 1981; ICMSF, 1985; Hobbs 1986).

Schlimme (1995) esclarece que frutos e hortaliças ligeiramente processados podem conter muitos microrganismos deteriorantes, incluindo leveduras, mofos, e bactérias. Ressalta, ainda, que algumas das bactérias que podem estar presentes nestes produtos são patogênicas aos consumidores, incluindo *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes*, além daquelas que chegam ao produto por contaminação humana durante a manipulação, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp* e *Salmonella sp*. Entretanto, a maior parte da microbiota presente nas hortaliças frescas é saprófita, tais como *Erwinia* e *Enterobacter*, coliformes, micrococcos, *Pseudomonas* presentes no ar, no solo e na água, como também bactérias Gram-positivas como *Bacillus* e bactérias corineformes. Fungos, tais como, *Fusarium*, *Alternaria* e *Aureobasidium* normalmente estão presentes, porém em quantidades inferiores às bactérias.

Splittstosser (1970) verificou que bactérias Gram-positivas foram isoladas na maioria das amostras de ervilhas frescas e feijões. Brackett (1988),

em estudos realizados em tomates frescos, encontrou proporções quase iguais de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *Flavobacterium* e *Pseudomonas* foram os gêneros mais comuns, como também bactérias corineformes. Ambos autores esclarecem que a maioria das bactérias encontrava-se na superfície dos frutos e hortaliças, embora o tecido interno possa também abrigar microrganismos. Por conseguinte, as condições ambientais antes, durante ou imediatamente após a colheita, podem afetar essa microbiota. Assim, a microbiota que cresce em frutos e hortaliças poderia mudar a cada dia.

É importante destacar que essa microbiota varia em quantidade e qualidade, de acordo com a espécie vegetal, local, clima e grau de desenvolvimento da planta. Com a poeira e a chuva, os microrganismos do solo chegam também indiretamente às hortaliças justificando que as partes externas estejam muito mais carregadas de microrganismos que o interior. De acordo com Müller (1981), em 1cm² de superfície das folhas pode haver de cem a milhões de germes. Assim, o conteúdo microbiano de alface, escarola, agrião, etc. vai diminuindo das folhas externas às centrais. Nas hortas cujo solo é regado com águas negras também podem ser encontrados microrganismos patogênicos como *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* e enterococos, podendo ainda ser encontrados ovos de helmintos.

As atividades humanas de cultivo e distribuição dos vegetais exercem importante efeito sobre a ação da microbiota. Por exemplo, o uso de pesticidas para eliminar insetos irá limitar a propagação de microrganismos. Por outro lado, o cultivo manual ou mecânico introduz e/ou distribui a microbiota em espaços ecológicos nos quais antes estavam ausentes (ICMSF, 1980 e 1985).

Até os dias atuais não foram estabelecidos os mecanismos pelos quais os microrganismos penetram nos tecidos vegetais. Sabe-se apenas que a presença dos mesmos não é prejudicial ao desenvolvimento da planta, existindo um equilíbrio de coexistência que poderá ser rompido sob certas condições,

iniciando-se assim o processo de deterioração.

Estudos realizados por Splittstoesser (1970) com frutas e hortaliças demonstraram que, na época da colheita, as contagens médias de leveduras encontravam-se entre $<10^3$ e 67.000/g de tecido. Este número era aumentado quando a chuva precedia a colheita, e quando a temperatura era inferior a 24°C. Os mecanismos de adaptação são também importantes no estabelecimento das populações microbianas que irão condicionar o desenvolvimento e multiplicação destes, com conseqüente deterioração dos produtos.

2.3 Microbiota contaminante

A microbiota das hortaliças cruas está influenciada por numerosos fatores e, geralmente, os microrganismos patógenos ao homem estão ausentes nos vegetais que não foram expostos ao risco de fertilização com dejetos humanos e animais e nem a irrigação com água poluída. Esses fatores podem contribuir com agentes etiológicos de diversas enfermidades infecto-contagiosas. Barriga et al. (1991) consideram que a microbiota normal em vegetais usualmente possui uma vantagem competitiva, o que torna improvável o crescimento de microrganismos patógenos. Contudo não é possível considerá-los imune.

O manuseio durante a colheita, desbaste, classificação e padronização, assim como utensílios e equipamentos usados nessas operações, contribui com o tipo e distribuição da microbiota nesses produtos. Além disso, as raízes, as folhas de crescimento baixo e os talos contaminam-se grandemente pelo uso de águas residuais ou água de irrigação contaminada. Por outro lado, a lavagem e a higienização podem ser prejudiciais, considerando que a água residual possibilitará uma rápida multiplicação dos microrganismos presentes (ICMSF, 1985).

É evidente que os microrganismos se desenvolvam mais rapidamente nos produtos fracionados, devido à maior disponibilidade de nutrientes e maior

área de exposição à contaminação. O processo higiênico e a refrigeração sob umidade adequada, durante tempo apropriado, diminuem os riscos de contaminação do produto e asseguram a inativação da população microbiana. Contudo, é difícil estimar a magnitude das mudanças durante estas fases de manipulação. As bactérias de significado em saúde pública despertam grande interesse em hortaliças, devido à sua proximidade com o solo e a possibilidade de contaminação com água de irrigação (King Jr. & Bolin 1989). Vários autores têm citado surtos de enfermidades alimentares veiculadas por bactérias, vírus ou protozoários decorrentes do consumo de vegetais contaminados com dejetos (Maxcy, 1982; Brackett, 1987a; Wilson & Wisniewski, 1989; Zottola & Smith, 1990; Barriga et al., 1991; Brackett, 1992; Madden, 1992; Nguyen-the & Carlin, 1994; Beuchat, 1996; Watada et al., 1996; Brackett, 1997). Outrossim, a transmissão de bactérias patogênicas e indicadores fecais por vegetais cultivados com fertilizantes orgânicos e água de irrigação poluída, com destaque especial para a presença de *Salmonella* e *Escherichia coli*, é demonstrada por diversos autores, (Müller, 1981; Barriga, et al., 1991; Nguyen-the e Carlin, 1994; Beuchat, 1996; Brackett, 1997).

Beuchat (1996) destaca que saladas contendo vegetais crus são identificadas como veículos de diarreia do viajante e, geralmente, estas estão associadas à presença de *E. coli* enterotoxigênica, especificamente o sorotipo O157:H7. Cita também surtos de salmonelose humana, atribuídos ao consumo de tomates, agrião, mostarda, broto de feijão, melão e melancia contaminados.

Patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, entre outros, são destacados como patógenos frequentes em produtos vegetais (Barriga et al, 1991; Hotchkiss & Banco, 1992; Madden, 1992; Marchetti et al., 1992; Manzano et al., 1995; Babic & Wataba, 1996; Beuchat, 1996; Bennik et al, 1996 e, 1998; Jong et al., 1998).

A presença de *L. monocytogenes* em campos fertilizados com sedimentos de dejetos aglutinados foi mostrada por Nguyen-the & Carlin (1994), em estudos realizados com alfafa cultivada, em que 10% das amostras continham de 3 a 5 UFC g⁻¹. As condições sanitárias insatisfatórias durante o cultivo e a colheita foram também incriminadas pelos autores, na contaminação de vegetais por *Campylobacter* sp.

Algumas bactérias patogênicas enterotoxigênicas são normalmente encontradas no solo e no meio ambiente nas áreas agrícolas, provavelmente decorrentes de contaminação externa, como *Clostridium* sp. e *Bacillus cereus*. Por outro lado, o ambiente aquático é o habitat normal de *Aeromonas hydrophila* (Marchetti et al., 1992; Nguyen-the & Carlin, 1994, Beuchat, 1996).

A contaminação por patógenos e sua multiplicação durante a estocagem sob refrigeração de frutos e hortaliças frescos é destacada por diversos autores (Berrang et al., 1989; Beuchat & Brackett, 1990; Nguyen-the & Carlin, 1994). A presença de *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *B. cereus*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, e *Aeromonas hydrophila* é destacada como sendo essas as principais contaminantes de produtos vegetais vinculados à poluição do solo e/ou água de irrigação (Nguyen-the & Carlin, 1994). A contaminação decorrente de manipulação perigosa na linha de processamento é também citada como fator concorrente para a presença desses microrganismos, principalmente *S. aureus*, *E. coli*, e *Salmonella* sp. Infecções ocasionadas por *Vibrio cholerae* são também associadas ao consumo de hortaliças cruas contaminadas por águas onde dejetos humanos e animais estão presentes (Nguyen-the & Carlin, 1994). Embora as viroses não estejam relacionadas ao consumo de frutos e hortaliças contaminadas, os vírus podem sobreviver por tempo suficiente para causar enfermidades humanas (Beuchat, 1996).

Sadovski & Farber (1980) destacam a presença de *Streptococcus faecium* em vegetais frescos, os quais foram cultivados com esterco e irrigados

com água não tratada. Os autores reportam que, quando os vegetais foram submetidos a irrigação com água sanificada, apresentaram contagens iguais tanto de *Streptococcus faecalis* como de *Streptococcus faecium*, sugerindo que ambas as espécies sobreviveram ao efeito da cloração da água. Esclarecem ainda que os enterococos são contaminantes comuns de alimentos congelados e que são utilizados como indicadores de qualidade sanitária inadequada nesses produtos. Por conseguinte, muitos trabalhos têm demonstrado que os enterococos, juntamente com outros grupos de microrganismos, estabelecem-se nas superfícies dos equipamentos e, portanto, podem ser considerados como microbiota "normal" de vegetais congelados.

Alguns surtos de gastroenterites humanas têm sido vinculados ao consumo de vegetais frescos contaminados e, em menor dimensão, às frutas. Geralmente, estão envolvidos na preparação de saladas mistas contendo vegetais crus, principalmente hortaliças folhosas, insuficientemente higienizados. Assim, surtos de salmonelose, diarreia do viajante ocasionada por *E. coli* O157:H7 e *Shigella flexneri*, listeriose humana, toxinfecções por *B. cereus*, *Aeromonas hydrophila*, etc., são frequentemente reportados por diversos autores (Corlett Jr., 1989; Marchetti et al., 1992; Nguyen-the & Carlin, 1994; Beuchat & Doyle, 1995; Manzano et al., 1995).

2.4 Fatores que interferem na microbiota de produtos hortícolas minimamente processados

O conteúdo microbiano do produto final depende, até certo ponto, da microbiota inicial do produto fresco e também daquela adquirida durante seu manuseio e elaboração. Assim, o aumento da microbiota será significativamente maior quando os microrganismos encontrarem condições favoráveis para seu crescimento e propagação. Considerando o método de processamento de vegetais minimamente processados (MP), como desbaste, lavagem, descasque, descaroçamento, corte, fatiamento, etc., que implicam em manuseio intenso por

longo tempo e geralmente à temperatura ambiente, frutos e hortaliças MP provêm um bom substrato para o crescimento microbiano (Nguyen-the & Carlin, 1994; Ayhan et al., 1998). A presença de superfícies cortadas, a liberação de sucos das células vegetais e o alto conteúdo de umidade nas embalagens aumentam potencialmente nesses produtos a deterioração por microrganismos. Este risco aumenta com a poluição ambiente durante o cultivo ou por condições higiênicas inadequadas durante o processamento (Ahvemainen, 1996; Ayhan et al., 1998).

Considera-se que a contaminação de frutos e hortaliças MP ocorre em vários estágios da cadeia alimentar, desde o cultivo até o processamento e distribuição. Segundo Hotchkiss e Banco (1992), a senescência e a perda da qualidade comestível são o resultado de processos enzimáticos intrínsecos, que são inerentes à planta. Outrossim, além da absorção de O₂ e da eliminação de CO₂, produção de calor e liberação de água, observa-se, durante o processo respiratório, uma eliminação de pequena quantidade de etileno, componentes voláteis, terpenos, álcoois, cetonas e aldeídos, que levam à senescência dos tecidos vegetais. Conseqüentemente, torna-os menos resistentes à ação microbiana (Bolin & Huxsoll, 1991; Awad, 1993).

Para que o crescimento microbiano resulte em deterioração e/ou possa oferecer perigo de toxinfecção alimentar, é necessário que fatores intrínsecos, de processamento e ambientais, que são interdependentes, possam se combinar para influenciar na colonização da microbiota, além de permitir o crescimento e sobrevivência durante o processamento (Scott, 1989). Assim, vários são os fatores que irão interferir ou influenciar no tipo e número de microrganismos presentes nestes produtos, destacando-se, entre outros, danos físicos, temperatura e condições atmosféricas de armazenamento, pH, umidade e/ou perda de água, tipo de processamento e manipulação, substâncias antimicrobianas presentes, conteúdo em nutrientes, irradiação e infecção

microbiana. Todos estes fatores associados irão influenciar na taxa e velocidade de deterioração e, conseqüentemente, na vida útil dos produtos.

2.4.1 Efeito da temperatura de estocagem na microbiota

As condições de armazenamento são aspectos de grande importância, que podem afetar tanto a população final como os tipos de microrganismos que crescem no produto fresco. Por isso, a influência do armazenamento e das condições de embalagem sobre os microrganismos precisam ser destacadas. A temperatura, a concentração de gases e a umidade relativa dentro da embalagem são, provavelmente, os fatores de maior destaque que incidem sobre a microbiota e determinação do período de vida útil do produto vegetal fresco. Na vida pós-colheita de frutos e hortaliças, a temperatura se destaca visto que seus efeitos não só são drásticos para as taxas respiratórias, como também para outras reações biológicas e bioquímicas que se processam após a colheita.

A maioria das enzimas perde a sua atividade depois de serem mantidas durante só alguns minutos a 60°C. Embora se saiba que há exceções, muitas enzimas de alimentos são sensíveis ao calor. Temperaturas frias são efetivas para reduzir a velocidade da taxa metabólica e, assim, retardar o colapso metabólico dos tecidos. A taxa de reações biológicas e bioquímicas normalmente diminui de duas a quatro vezes para cada 10°C de diminuição em temperatura. Abaixando-se a temperatura de 10°C para 0°C diminui-se a atividade enzimática à metade (King & Bolin, 1989).

As condições ambientais durante o armazenamento, vão influenciar na microbiota e no tempo de duração do produto fresco, garantindo ou não a segurança deste ao consumo (Müller, 1981).

Uma série de métodos e processos de armazenamento foi desenvolvida para combater estes fatores de deterioração. Tratamentos comerciais pós-colheita e sistemas de preservação de alimentos frescos combinam

frequentemente vários métodos denominados de tecnologia de barreira. Para isso, geralmente, o emprego de calor para branquear, pasteurizar, cozinhar, etc., ou mesmo processos de desinfecção de alimentos, são estabelecidos (Hoover, 1997). Entretanto, o processo térmico normalmente diminui a qualidade sensorial e nutricional, e os produtos perdem as características de fresco. Assim, métodos tradicionais não térmicos vêm sendo utilizados para preservar frutos e hortaliças, e incluem lavagem com substâncias químicas sanificantes, armazenamento em baixas temperaturas, embalagem sob atmosfera controlada ou modificada, embalagem a vácuo moderado, uso de preservativos químicos, irradiação e uso de filmes e revestimentos, comestíveis ou não (Khurdiya, 1995; Ahvemainen, 1996; Hoover, 1997).

Estima-se que temperaturas entre 0,6°C e 3,3°C podem ampliar a vida útil dos vegetais MP entre 5 a 18 dias. Pois a degradação da qualidade é retardada pelo decréscimo da temperatura do tecido vegetal, ocasionando uma redução na taxa respiratória (Scott, 1989). Conseqüentemente, as perdas sensoriais podem ser reduzidas, devido às mudanças oxidativas dos pigmentos e lipídios, assim como redução da velocidade das oxidações bioquímicas durante a senescência (Scott, 1989; Watada et al., 1990; Awad, 1993; Wiley, 1997; Watada et al., 1996).

Frutos e hortaliças minimamente processados são geralmente estocados sob temperaturas de refrigeração variando entre 4° a 10°C, o que, provavelmente, selecionará microrganismos psicrotróficos. A presença de bactérias mesófilas e psicrotróficas vem sendo denunciada por diversos autores em alface, brócolis, repolho, cenoura e cogumelos, entre outros produtos fatiados, rasgados e/ou cortados mantidos sob refrigeração (Beuchat e Bracket, 1990; Awad, 1993; Floros, 1993; Nguyen-the & Carlin, 1994; Ayhan et al., 1998).

A maioria dos autores é unânime em afirmar que, embora as

temperaturas de refrigeração prolonguem a vida útil destes produtos, diminuindo a velocidade de crescimento da microbiota presente e que o crescimento de organismos mesófilos é significativamente reduzido quando a temperatura é mantida abaixo de 10°C, estas são seletivas para microrganismos patogênicos e/ou toxígenos psicrotróficos e psicrotolerantes, e ao desenvolvimento de bactérias ácido-láticas que parecem ser mais consistentes, dependendo da temperatura. Assim, trabalhos reportados por Nuguyen-the & Carlin (1994) mostraram que as bactérias ácido-láticas multiplicaram-se, somente num curto espaço de tempo, a 7°C, mas prevaleceram após estocagem à 30°C. Embora considerem que as baixas temperaturas selecionaram os microrganismos psicrotróficos e que as contagens de bactérias mesófilas em alguns produtos refrigerados possam representar menos de 1% das contagens bacterianas iniciais. Ressaltam também que a prevalência de *Pseudomonas fluorescens* e, mais particularmente, as espécies pectinolíticas podem explicar o efeito das baixas temperaturas sobre esses microrganismos.

Longo tempo de estocagem e temperaturas de refrigeração vão ser seletivos para organismos psicrotróficos (Babic & Watada, 1996; Brackett, 1987a; Bennik et al., 1998). Isto não só afeta o armazenamento, mas pode, sobretudo, afetar as alterações microbianas do produto.

De acordo com Brackett (1987a), a temperatura é o fator primário no controle do crescimento microbiano em frutos e hortaliças MP. As baixas temperaturas reduzirão a velocidade de crescimento da maioria das bactérias e fungos. Porém, vale ressaltar que estas mesmas condições selecionarão e favorecerão a multiplicação dos microrganismos psicrotróficos, como *Pseudomonas*, que freqüentemente estão associados à deterioração de alimentos refrigerados e podem estar presentes em grandes números nos produtos vegetais. Visto que o processamento mínimo requer lavagem intensa dos vegetais e manutenção sob temperaturas de refrigeração, e também que as *Pseudomonas*

são psicrotróficas e normalmente estão presentes na água, a presença destas bactérias representa um grande perigo para deterioração e redução da vida útil destes produtos (Kraft & Rey, 1979).

Algumas bactérias patogênicas crescem bem sob condições de refrigeração e, por isso, são causa de grande preocupação (Brackett, 1992). Estudos realizados por Freire Jr. (1999) com alfaces cortadas, mantidas em sacos plásticos termosoldados, sob temperaturas de 2°C e 10°C, revelaram que o número de bactérias aumentou ao final do armazenamento a 2°C, atingindo valores próximos a 10^6 UFC g⁻¹ e índices de 10^8 UFC g⁻¹ quando mantidos a 10°C, após 14 dias de estocagem. Destaca que, coliformes totais e fecais, bactérias mesófilas, assim como *Pseudomonas*, tiveram seus índices aumentados significativamente. Estes resultados encontram respaldo nos experimentos realizados por King Jr. et al. (1991) que, após inspeção visual e contagem inicial, estocaram alfaces MP embaladas a 1,1°C ou 2,8°C por 14 dias. Em ambos os casos, observaram que as contagens aumentaram significativamente, concluindo que a habilidade das bactérias e leveduras para multiplicarem-se em baixas temperaturas indica a sua habilidade potencial para causar deterioração nesses produtos.

Outro fator a ser destacado com relação ao efeito da temperatura é sua ação sobre a respiração do produto vegetal. É sabido que as temperaturas de armazenamento determinam a taxa respiratória de vegetais e, assim, produzem mudanças na atmosfera gasosa dentro da embalagem, influenciando no comportamento dos microrganismos. Conseqüentemente, a temperatura pode também influenciar na velocidade de senescência dos produtos MP (ICMSF, 1980; Cantwell, 1992; O'Connor-Shaw et al., 1994; Gorny et al. 1998).

Existe uma preocupação de que patógenos frio-tolerantes, como *Listeria monocytogenes*, possam crescer em baixas temperaturas, podendo alcançar índices perigosos à saúde do consumidor (Bennik et al., 1996). Berrang et al.

(1990) mostraram que aspargos frescos com uma vida útil prolongada podem apresentar um aumento do perigo microbiológico. Esses autores encontraram que, embora os aspargos mantivessem a qualidade sensorial em atmosfera controlada, *Listeria monocytogenes* continuavam crescendo.

Algumas bactérias, mais notadamente as *Pseudomonas*, crescem de forma relativamente rápida sob condições de refrigeração; em adição, muitas espécies pectinolíticas são importantes causas de deterioração em produtos frescos, (Brackett, 1987; Barriga et al., 1991; King et al., 1991; Cantwell, 1992; Brackett, 1992; Hotchkiss & Banco, 1992; Nguyen-the & Carlin, 1994; Babic & Watada, 1996; Bennik et al., 1998). Assim, sob refrigeração, são comuns as mudanças de deteriorações bacterianas nos produtos. Ou seja, produtos que, em temperatura ambiente, apresentam deteriorações por *Erwinia caratovora*, sob refrigeração podem permitir o crescimento de *Pseudomonas*, modificando assim a microbiota deteriorante do produto.

Estudos realizados por O'Connor-Shaw et al. (1994) com frutas MP informam que, nos grupos particulares dos microrganismos testados, destacando os lactobacilos, enterobactérias, leveduras e mofos, estas tiveram contagens superiores quando comparadas às frutas frescas inteiras. Por outro lado, ressaltam que os microrganismos cresceram mais rapidamente nas frutas estocadas a temperaturas $>4^{\circ}\text{C}$, enquanto que a temperatura de 4°C não foi suficiente para deter o crescimento microbiano. Merecem destaque especial nesta pesquisa as altas contagens globais de microrganismos em amostras de mamão, que chegaram a ser mil vezes superiores após 11 dias de estocagem, quando comparadas às contagens em kiwi e abacaxi.

Estes poucos resultados podem indicar que a deterioração microbiana é provavelmente mais significativa em altas temperaturas de estocagem. Embora, microrganismos frio-tolerantes possam permanecer e multiplicar lentamente, alcançando índices perigosos à saúde do consumidor.

Dois fatores são destacados por Nguyen-the & Carlin (1994) para explicar os efeitos da temperatura sobre a taxa de crescimento microbiano em produtos vegetais. Primeiramente, as temperaturas de estocagem determinam a taxa respiratória dos tecidos vegetais e, assim, as mudanças na atmosfera gasosa na embalagem podem influir no comportamento da microbiota. Por outro lado, a temperatura pode também interferir na taxa de senescência de frutos e hortaliças MP e, desse modo, modificar o ambiente para os microrganismos. Se, por um lado, estes fatores poderão inibir a atividade microbiana, por outro, selecionarão e favorecerão o crescimento de microrganismos patogênicos e/ou toxígenos mais perigosos, uma vez reduzida a competitividade entre eles.

Assim, o comprovado crescimento de microrganismos em temperaturas recomendadas para armazenamento e comercialização dos produtos hortícolas MP não oferece segurança para o consumidor, considerando que a presença de microrganismos patogênicos e/ou toxígenos não é inibida e a deterioração microbiana pode ser rápida quando contagens iniciais elevadas são observadas.

2.4.2. Efeito da atmosfera modificada

Como resposta ao consumo aumentado de frutas e hortaliças frescas, juntamente com a necessidade de oferecer produtos de qualidade, novas tecnologias de embalagem e armazenamento têm sido desenvolvidas. O uso de gases na embalagem de produtos vegetais ou, ainda, a utilização de vácuo parcial, têm por finalidade inibir ou retardar os processos fisiológicos, como respiração, amadurecimento e deterioração, além de minimizar a ação de microrganismos deteriorantes, conseqüentemente prolongando a vida útil de frutos e hortaliças frescos (Floros, 1993). Prieke et al. (1976) realizaram a avaliação da produção de CO_2 e consumo de O_2 para determinar os efeitos de várias condições ambientais e taxa respiratória que, após 2 dias de estocagem, o acúmulo de CO_2 nas embalagens de alfaces cortadas foi maior que no produto

intacto e as contagens totais excederam 10^8 UFCg⁻¹.

A maioria dos estudos conduzidos adota tecnologias de empacotamento sob atmosfera controlada ou modificada. Estes métodos alteram os gases que cercam a respiração do produto, no intuito de reduzir a sua velocidade de senescência normal ou deterioração (Shewfelt, 1986; Ronk et al., 1989; Hotchkiss & Banco, 1992; Awad, 1993; Floros, 1993; Mohd-Som et al., 1994; Manzano et al., 1995; Senesi et al., 1999; Piergiovanni et al., 1999; Senesi et al., 2000).

O sistema de embalagem, segundo Manzano et al. (1995), tem influência fundamental na atividade metabólica dos produtos vegetais. Por isso, a escolha das concentrações de CO₂ e O₂, o tipo de filme e a temperatura de estocagem são muito importantes. O nível de gás nas embalagens sob atmosfera modificada geralmente está em função da permeabilidade do filme escolhido, do comportamento respiratório e das mudanças nas características do produto. O objetivo principal da embalagem é a seleção de filmes com permeabilidades que avaliem os níveis de gases favoráveis para estender a vida útil dos produtos (Cameron et al. 1995).

Os gases mais usados são dióxido de carbono (CO₂), óxido de etileno, óxido de propileno, dióxido de enxofre e o ozônio (Brecht, 1980; Deak, 1984). Mas, geralmente, o mais utilizado é o CO₂. De acordo com Breck (1980) e Kramer et al. (1989), normalmente este método envolve a redução de oxigênio e elevação da concentração de gás carbônico. Cantwell (1992) reporta que baixos níveis de oxigênio e índices elevados de CO₂, em conjunção com monóxido de carbono, retardam o crescimento microbiano. Hotchkiss & Banco (1992) esclarecem que um fator primário na taxa de deterioração desses produtos é a composição dos gases que os cercam. Citam ainda que, em brócolis, a redução na concentração de O₂ para aproximadamente 2% e o aumento de 5% do CO₂ resultaram em mais de dez vezes o declínio na taxa respiratória. Os autores

destacam que uma pequena elevação de O₂ ou CO₂ podem causar amadurecimento irregular, aumento do escurecimento e desenvolvimento de odores e sabores estranhos. Outra desvantagem é que, para saladas mistas MP, cada item do produto pode ter combinações de gases diferentes que reduzem a deterioração e, assim, o sistema de empacotamento terá que ser adequado para cada item do produto.

Segundo Kader (1992), a redução de oxigênio e a elevação de dióxido de carbono, quando intencional (atmosfera modificada ativa) ou não (atmosfera modificada passiva devido a restrição da ventilação durante transporte e armazenamento), podem acelerar a deterioração de produtos hortícolas frescos. Esclarece que a magnitude deste efeito depende, sobretudo, do artigo, cultivar, idade fisiológica, níveis de O₂ e CO₂, temperatura e duração do manuseio.

O uso de atmosfera controlada e/ou modificada pode alterar o perfil da microbiota presente nesses produtos, no que se refere ao desenvolvimento de bactérias Gram positivas anaeróbias e anaeróbias facultativas e, mais especificamente bactérias ácido-láticas (Deak, 1984; Brackett, 1987a; Kader, 1992; Hotchkiss & Banco, 1992). Existe ainda grande preocupação de que patógenos frio-tolerantes, como *Listeria monocytogenes*, que podem crescer sob baixas condições de O₂, possam proliferar a níveis perigosos durante o armazenamento sob atmosfera modificada (Bennik et al., 1996).

A aplicação de atmosfera controlada ou modificada em embalagens durante o armazenamento de vegetais, em combinação com a refrigeração, permite estender o período de comercialização destes, proporcionando também ao consumidor produtos de melhor qualidade durante períodos de tempo mais longos. Além disso, mantém sua higiene, características físico-químicas e sensoriais (Manzano et al., 1995; Senesi et al., 1999; Senesi et al., 2000).

Acredita-se que o efeito inibitório do CO₂ no crescimento da bactéria resulte principalmente da difusão do H₂CO₃ através da membrana bacteriana,

causando mudanças no pH intracelular, assim como algumas mudanças enzimáticas no metabolismo da célula. Futuramente, a elevação da concentração de CO₂ pode inibir as reações de descarboxilação, em que o CO₂ é liberado por mecanismo de "feedback". Esses efeitos são maiores a baixas temperaturas porque aumentam a solubilidade do CO₂ (Bennik et al., 1998).

O uso de embalagens para produtos MP utilizando filmes poliméricos permeáveis, contentores semi-rígidos, ou ambos, são indicados para reduzir a concentração de O₂ e elevar a taxa de CO₂ da atmosfera no interior da embalagem. Retarda-se assim a degradação da qualidade, não só aumentando a vida útil como reduzindo ou retardando a ação da microbiota presente no produto (Schlimme, 1995; Manzano et al., 1995; Pirovani et al., 1998).

Barriga et al. (1991) realizaram estudos com alface MP estocada por 12 dias sob 3% de O₂, 3% de O₂ mais 5% de CO₂ ou 3% de O₂ mais 10% de CO₂. O efeito sobre a microbiota aeróbia mesófila, psicrotrófica, coliformes totais e bactérias foi pequeno ou nenhum. A qualidade visual do produto manteve-se aceitável, sem afetar apreciavelmente o desenvolvimento microbiano, mesmo quando mantido a 3% de O₂ e 10% de CO₂. Estes resultados obtiveram respaldo de Pirovani et al. (1998) em testes com alface fatiada MP, acondicionadas em bolsas de polietileno seladas e também em bandejas, ambas estocadas a 4° C. Estes autores observaram que o tipo de acondicionamento não foi um fator significativo para a microbiota, mas foi significativo para as mudanças na composição de gás e atributos sensoriais e visuais.

Bennik et al. (1996), em pesquisas realizadas com chicória endívia sob atmosfera modificada, para estabelecer as características da microbiota, encontraram que as condições que eram favoráveis à qualidade dos produtos retardaram o crescimento de microrganismos deteriorantes durante o armazenamento à baixa temperatura. Contudo, o crescimento de patógenos psicrotróficos, como *Listeria monocytogenes*, inoculados no produto, não foram

inibidos. Concluíram ainda que, reduzindo a carga microbiana inicial por meio da desinfecção, puderam minimizar a deterioração microbiana e o estado sanitário do produto. Porém, *L. monocytogenes* cresceram melhor no produto desinfetado que naqueles não desinfetados, ou no produto lavado apenas com água. Para os autores, isso determina a importância da desinfecção e prática higiênica adequada para evitar a recontaminação.

Frutos e hortaliças minimamente processados são também comercializados em embalagens a vácuo. Estudos realizados por Silva Jr. et al. (1994) com amostras de vegetais para determinação das contagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* verificaram que o vácuo não inibiu totalmente o metabolismo dos microrganismos saprófitos ou patogênicos presentes nas amostras. No entanto, ressaltam que, quando o vácuo estava conjugado com a temperatura de refrigeração, existiu uma associação de fatores que reduziram a reprodução dos microrganismos, melhorando as condições de armazenamento do produto, dado que o vácuo evita a oxidação com o oxigênio do ar.

2.4.3 Efeito do pH

Os distintos valores de pH dos produtos vegetais agem sobre estes determinando a microbiota deteriorante e patogêna. À medida que os valores de pH decrescem, maior será a seleção da microbiota, assim como pH mais baixo causa um desdobramento da molécula de proteína por rompimento dos laços de hidrogênio. Isto reduz a atividade enzimática e aumenta a sensibilidade para desnaturação. O pH pode também afetar a sensibilidade da enzima ao calor (ICMSF, 1980; King & Bolin, 1989).

O pH, principalmente de frutas, é o fator limitante no crescimento dos microrganismos e geralmente encontra-se em interação com outros fatores como nutrientes, aw, temperatura e potencial de oxirredução. Assim, pH ácido aumenta o poder microbicida do calor, efeito esse observado tanto para as

formas vegetativas quanto para as esporogênicas (Müller, 1981). Os valores de pH alcalinos também dificultam o crescimento de certos microrganismos (ICMSF, 1980; Mossel & Garcia, 1983; Awad, 1993).

O efeito inibitório de determinado pH depende, em primeiro lugar, do tipo de ácido (lático, cítrico, propionico, butírico, etc.) e da interação com todos os outros fatores inerentes ou não ao produto. Estudos demonstram que os ácidos orgânicos são mais efetivos que os ácidos inorgânicos na inibição dos microrganismos e, embora existam exceções, o ácido acético e o ácido lático são geralmente mais inibitórios que o ácido cítrico, (Scott, 1989, Watada et al., 1996).

O tipo de ácido e o pH interagem para inibir o crescimento microbiano. Pesquisas divulgam que o pH mínimo para crescimento de *Listeria monocytogenes* é 5,2 quando o ácido acético é o acidulante, mas que este pH cai para 5,0 quando o acidulante é o ácido lático. O autor informa que as interações de pH com o ácido fosfórico, o ácido cítrico, ou ácido lático têm se mostrado efetivas como antimicrobianos sobre *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella sp* (Scott, 1989).

Outras interações de pH também vão exercer certa barreira ao crescimento microbiano. Babic & Watada (1996) reportam que a atmosfera controlada exerceu certa influência no pH de folhas de espinafre "fresh-cut". Quando mantidas sob CA, o pH das folhas mostrou-se mais baixos que quando sob ar natural, à temperatura de 10° C, até dois dias de armazenamento. Entretanto, estas diferenças não foram consistentes após quatro dias e não houve diferença notável após sete dias de armazenamento.

2.4.4 Efeito da umidade e atividade de água (aw)

A perda da qualidade de produtos vegetais está intrinsecamente relacionada à perda d'água. Essa perda ocorre por meio da transpiração e não resulta apenas em perdas quantitativas, mas também qualitativas, como

aparência, textura, vigor, grau de frescura e suculência, além de nutrientes (ICMSF, 1980; Kader, 1992; Awad, 1993; Schlimme, 1995).

A baixa umidade desencorajará o crescimento bacteriano na superfície de frutos e hortaliças. Porém, estas mesmas condições conduzem à desidratação e ressecamento do produto, resultando em baixa qualidade, além de permitir a infecção com mais êxito por fungos e leveduras, que toleram ambientes com baixa umidade (xerófilos e osmófilos, respectivamente) (Brackett, 1987a; Cantwell, 1992).

Acredita-se que o armazenamento de frutos e hortaliças em condições de umidade alta resulte em menor tensão fisiológica para o alimento. Entretanto, estas mesmas condições aumentam o crescimento microbiano e permitem a rápida deterioração fúngica (Brackett, 1987a).

Flutuações nas taxas de temperatura aumentam freqüentemente o problema uma vez que a umidade condensa no produto, permitindo que qualquer microrganismo presente seja facilmente disseminado (Lund, 1971; Brackett, 1987a).

No produto inteiro, a água nos espaços intercelulares não é exposta diretamente às condições externas de umidade atmosférica. Contudo, ao serem cortados e descascados, frutos e hortaliças expõem o interior dos tecidos e aumentam drasticamente a taxa de evaporação da água devido ao aumento da superfície de exposição (Floros, 1993). Assim, a manutenção da aparência visual e valor nutritivo dos produtos MP é crítica. Por outro lado, a perda de sucos intracelulares pelo vegetal, além de favorecer a disseminação da microbiota presente, proverá uma desidratação que induz ao estresse e afeta a produção de etileno (Brecht, 1995).

Alguns métodos, como centrifugação, são recomendados para completa remoção da água da superfície das hortaliças e, assim, reduzir o crescimento microbiano (Cantwell, 1992).

Segundo Brackett (1997), muitas das mudanças que acontecem na microbiota de hortaliças e frutos frescos embalados, estão relacionadas à mudança da umidade e atmosfera dentro da embalagem. Alguns pesquisadores notaram que o filme de empacotamento individual aumenta a população de bactérias aeróbias em vegetais frescos (Brackett, 1987a; Deak et al., 1984; King Jr. & Bolin, 1989; Manzano et al., 1995; Watada et al., 1996). Este aumento populacional é atribuído à grande quantidade de umidade condensada dentro dos pacotes, sendo que o perfil microbiológico destes produtos também difere. Enquanto nas amostras não embaladas permaneceram proporções iguais de bactérias aeróbias Gram positivas e Gram negativas, naquelas embaladas predominaram as bactérias Gram positivas e, freqüentemente, microrganismos anaeróbios e microaerófilos (Hotchkiss & Banco, 1992; Nguyen-the & Carlin, 1994; Babic & Watada, 1996; Ayhan et al., 1998).

2.4.5 Efeito da manipulação e do processamento

As operações envolvidas na preparação de frutos e hortaliças MP geralmente reduzem a vida útil dos mesmos (Brackett, 1987a; Cantwell, 1992; Brecht, 1995). O corte, o descasque, a raspagem, o descaroçamento, o fatiamento, etc. levam a mudanças fisiológicas que resultam no comprometimento da qualidade visual. A perda da integridade celular destrói a compartimentalização de enzimas e substratos, ocasionando reações de escurecimento e formação de metabólitos secundários indesejáveis. Por outro lado, o processo de maturação e senescência pode ser acelerado com produção de odores indesejáveis decorrentes da aceleração da respiração e da produção de etileno (Brecht, 1995).

O aumento na produção de etileno além de influenciar na vida útil do produto, é um estímulo a elevação do processo respiratório que aumenta a degradação do amido e do ciclo do ácido tricarbóxico (Abe & Watada, 1991;

Brecht, 1995).

Danos no tecido vegetal podem também causar a degradação da membrana lipídica, ocasionando perda de compostos lipídicos e induzindo a elevação da taxa de etileno. Conseqüentemente, haverá uma redução da biossíntese de fosfolipídios (Watada et al., 1990). O dano respiratório de alguns tecidos vegetais é relatado como responsável pela alfa-oxidação dos ácidos graxos, devido à liberação de CO₂ após o fatiamento (Shewfelt, 1987; Zhou et al., 1992; Brecht, 1995).

A liberação de exsudatos, devido ao corte e manuseio intenso, é favorável ao crescimento de microrganismos, aumentando as oportunidades de contaminação por patógenos toxigenos (Bolin & Huxsoll, 1989; King & Bolin, 1989; Watada et al., 1990; Brecht, 1995).

Para obter um alto padrão de qualidade, todo ponto crítico durante o processamento e empacotamento dos vegetais deve ser considerado e monitorado. A raspagem ou descasque, fatiamento e higiene, tanto quanto o tratamento de desinfecção com cloro e/ou adição de antioxidantes, centrifugação, embalagem e estocagem, devem ser executados com grande cuidado para prevenir a deterioração físico-química e microbiana (Manzano et al., 1995).

2.4.6 Sistema de proteção natural

Embora não seja tão eficaz quanto o sistema humano ou animal, os frutos e hortaliças possuem também, até certo ponto, um sistema de defesa que impede o desenvolvimento e deterioração microbiana. As hortaliças dispõem de uma estrutura tissular fechada, que protege não só do ataque microbiano, como também de certos agentes traumatizantes e da dessecação, tais como a casca, membrana cutinizada ou cutícula onde se depositam camadas de cera. Quando sofrem danos físicos, os tecidos vegetais se fecham e protegem da entrada de

microrganismos e da perda de água (Brackett, 1987a; King Jr. & Bolin, 1989; Cantwell, 1992; Brecht, 1995). É sabido que as lesões produzidas nas hortaliças por insetos e outros animais, ou por danos mecânicos durante a colheita, transporte e armazenamento, tornam possível a penetração de organismos saprófitos e ou patógenos nos tecidos, resultando em alterações mais ou menos graves e acelerando o processo de deterioração.

As hortaliças possuem um período de conservação limitado, considerando que, alcançado o desenvolvimento pelos sistemas naturais de proteção, oferecem uma defesa muito limitada frente à ação de microrganismos e parasitos. É importante destacar que as enzimas respiratórias dos tecidos vegetais, que continuam ativas após a colheita, conduzem à alteração, se não for controlado o processo respiratório durante o armazenamento e a comercialização. As alterações enzimáticas cursam geralmente com as alterações microbianas. Distintos tipos de deteriorações, denominadas de "podridão", devido ao abrandamento dos tecidos vegetais, são então observadas ocasionadas por bactérias, principalmente dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, ou fungos, destacando-se *Sclerotinia*, *Alternaria*, *Rhizopus* e *Colletotrichum*, (Müller, 1981; Lund, 1981; ICMSF, 1980; Jay, 1994).

Além das estruturas tissulares, muitos vegetais possuem substâncias químicas defensivas, com ação bactericida ou fungicida, como o ácido cítrico, málico, benzóico, salicílico, entre outros. Essas substâncias funcionam como barreiras naturais, baixando o pH do suco celular, limitando assim o número de espécies capazes de multiplicar-se e, conseqüentemente, retardando a deterioração microbiana. Entretanto, esta ação é mais eficaz nas frutas (Wilson & Wisniewski, 1989).

Estas substâncias antimicrobianas são compostos químicos naturais presentes nos alimentos ou substâncias adicionadas intencionalmente com ação inibitória sobre a microbiota. Entretanto, as barreiras oferecidas por estas

substâncias não são suficientes quando a taxa microbiana inicial encontra-se elevada, ou mesmo quando o alimento sofreu algum dano ou injúria que comprometa o seu metabolismo (Wilson & Wisniewski, 1989).

A adição de agentes ativos de superfície, surfactantes e emulsificantes, reduz a atividade de água e, conseqüentemente, a perda de umidade dos produtos, inviabilizando assim o crescimento de muitos microrganismos. Para alguns produtos MP, o uso de substâncias preservativas pode ser incorporado à embalagem para preservar o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras durante o armazenamento (Baldwin et al., 1995). Segundo os autores, substâncias antimicrobianas, como ácido benzóico, benzoato de sódio, ácido sórbico, sorbato de potássio e ácido propionico, são usadas em vários produtos para impedir a penetração de microrganismos na superfície cortada.

O uso de agentes químicos para conservação de produtos vegetais deve-se, principalmente, à necessidade de inativação enzimática ou microbiana (Flores, 1993).

2.4.7 Teor de nutrientes

Frutos e hortaliças são alimentos reconhecidamente ricos em vitaminas e sais minerais, alta taxa de água livre, variando no teor de açúcares, lipídios e proteínas. Assim, a seleção da microbiota deteriorante desses alimentos será realizada principalmente pelo seu teor em nutrientes. Microrganismos proteolíticos, lipolíticos e sacarolíticos crescem mais rapidamente nos alimentos que contenham altas concentrações de proteínas, lipídios e carboidratos, respectivamente e, conseqüentemente, haverá uma seleção de acordo com a composição centesimal destes.

Pequena informação encontra-se disponível sobre as mudanças que ocorrem nos nutrientes durante o transporte e armazenamento de produtos frescos. Na maioria dos estudos disponíveis, enfatizam-se as perdas de nutrientes durante os processos térmicos como branqueamento e enlatamento, sem,

contudo, fazer uma relação com a atividade microbiana.

Os métodos mais recentes de comercialização de frutos e hortaliças frescos denominados de minimamente processados, aumentam as questões sobre a ação da microbiota presente e seus efeitos sobre a qualidade e segurança dos produtos. Pois, além de disponibilizar os nutrientes para o crescimento, a liberação do substrato do interior da célula aumenta a perda de vitaminas, principalmente as lábeis.

A perda da estabilidade das vitaminas é citada por Klein (1987) como consequência de vários fatores, inclusive pelo rompimento celular por dano ao tecido, corte ou moedura. Estes traumatismos resultariam no aumento da atividade enzimática, em que o contato do substrato com as enzimas ocasionariam principalmente, a perda rápida de vitaminas.

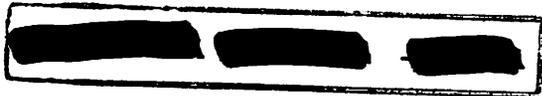
Estudos realizados por Senesi et al. (2000), para verificar as mudanças fisiológicas e microbiológicas em vegetais "fresh-cut", mostraram que o teor de vitamina C e as características organolépticas mantiveram-se aceitáveis durante e após a estocagem. Destacam que o teor de vitamina C não foi afetado durante o período de estocagem, indicando que o processamento mínimo mantém o nível inicial de vitamina C.

Alterações na composição de frutos e hortaliças acontecem frequentemente durante o transporte a longas distâncias devido à alta atividade respiratória nos produtos e à geração de calor (ICMSF, 1980; Klein, 1987). As condições que preservam a integridade física de frutos e hortaliças, e mantêm as características sensoriais desejáveis, também preservarão os seus nutrientes, além de impedir a ação precoce por microrganismos.

2.5 Patógenos em vegetais minimamente processados

2.5.1 *Escherichia coli*

A importância da *Escherichia coli* como patógeno humano foi



reconhecida, praticamente desde seu descobrimento, em 1885. Está relacionada com casos de diarreia, principalmente em crianças e idosos, com colites hemorrágicas (HC), disenterias, infecções da bexiga e dos rins, infecções de feridas cirúrgicas, septicemia, síndrome urêmica-hemolítica (HUS), pneumonia e com a meningite. Muitas vezes estas enfermidades culminam em óbitos (Mossel & Garcia, 1983; Heizmann et al., 1988; ICMSF, 1998; Chen et al., 1998; Bell & Kyriakides, 2000a).

O patógeno intestinal *E. coli* é definido como aquelas cepas que são capazes de causar uma enfermidade diarreica no homem e nos animais. Atualmente, seis tipos principais de *E. coli* patogênico são relacionados: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC; *E. coli* O157:H7), *E. coli* enteroagregante (EaggEC), e *E. coli* difusamente aderente (DAEC), (Buchanan & Doyle, 1997; ICMSF, 1998; Bell & Kyriakides, 2000a).

Recentemente, a importância da *E. coli* foi relacionada com a presença de cepas produtoras de citotoxina Vero (VTEC), mais concretamente com cepas VTEC do sorogrupo O157 que têm ocasionado surtos de toxinfecções alimentares com morbidade e mortalidade importantes (Bell & Kyriakides, 2000a).

O habitat principal da *E. coli* é o trato intestinal do homem e de animais de sangue quente. As infecções são transmitidas por três vias principais: diretamente dos animais, incluindo o gado, os animais domésticos e aves, mediante propagação pessoa-a-pessoa e por meio de alimentos e água contaminados, (Del Rosario & Beuchat, 1995; Chen et al., 1998; ICMSF, 1998; Bell & Kyriakides, 2000a).

Embora não existam padrões microbiológicos regulamentares para produtos hortícolas minimamente processados, Pereira et al. (2001) ressaltam que a presença de microrganismos é um indicador seguro de inconformidade

ocorrida antes, durante e após as fases de processamento. Por isso, é fundamental para a segurança, a qualidade e a previsão da durabilidade dos produtos. Os autores acreditam que a introdução de métodos rápidos para detecção dessa microbiota seja fundamental para o controle efetivo da qualidade dos produtos durante a fase de comercialização.

Segundo Mossel & Garcia (1983), todo tipo de alimento pode contaminar-se com cepas de *E. coli* enteropatogênicas, partindo de manipuladores, excretas humanas e animais, etc. Estudos mostram que o gado é o maior reservatório para VTEC e que portadores de VTEC clinicamente sadios podem servir como fonte de contaminação de carnes processadas e produtos lácteos, por introduzir o microrganismo na planta de processamento (Chen et al., 1998).

Beuchat (1996) informa que surtos de diarreia do viajante ocorridos no México e Estados Unidos, em 1974, foram causados por *E. coli* enterotoxigênica associada ao consumo de saladas contendo vegetais crus. A contaminação do solo, da água e dos alimentos por microrganismos provenientes do esterco animal tornou-se um tópico de interesse recente na segurança sanitária de produtos vegetais. O esterco animal pode conter bactérias, incluindo muitos tipos de patógenos que, mesmo em pequenos índices, podem se multiplicar quando são expostos a condições ambientais favoráveis e nutrientes disponíveis.

Não existe regulamentação para o número de patógenos no solo, embora sedimentos de esgotos humanos possam ser tratados para reduzir o índice de patógenos e posterior uso em campos agrícolas. Gagliardi & Karns (2000) chamam a atenção para alguns surtos recentes envolvendo *E. coli* O157:H7, espécies de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium paratuberculosis*, além de alguns vírus entéricos e protozoários, provenientes de doenças traçadas para o gado leiteiro e de corte, veiculados pela ingestão de vegetais contaminados a partir dos campos agrícolas.

Bell & Kyriakides (2000a) informam que em exames recentes realizados em amostras de fezes de aves selvagens, foram isoladas *E. coli* VTEC O157:H7. Demonstraram, assim, a possibilidade de que as aves marítimas, que habitualmente se alimentam de forragem nas granjas e fazendas, veiculam patógenos humanos graves por meio do ambiente agrícola primário.

A *E. coli* entero-hemorrágica é reconhecida como um patógeno tóxico emergente, e a virulência dessas cepas inclui o sorotipo O157:H7 (Buchanan & Doyle, 1997). Atualmente, estes patógenos são mais significativos que outros patógenos tóxicos reconhecidos por razões que incluem desde as severas consequências da infecção que afeta todos os grupos etários, como também por sua baixa dose infectiva, sua incomum tolerância a ácidos e sua aparente e inexplicável associação com ruminantes usados para alimentação (Chapman, 1995; Buchanan, 1997; Chen et al., 1998; Bell & Kyriakides, 2000a).

A população de maior risco é composta por indivíduos jovens, os idosos, mulheres durante a gestação e indivíduos imunocomprometidos (Chapman, 1995; Johnson et al., 1995; McIngvale et al., 2000). Estimativas baseadas em evidências epidemiológicas de surtos recentes informam que menos de dez bactérias por grama de alimento pode ser suficiente para causar infecções em indivíduos sensíveis (Suslow, 1999).

Considerando o baixo número de células bacterianas necessárias para causar infecção, a multiplicação no produto infestado não é, necessariamente, um pré-requisito requerido para determinar uma infecção humana. Por outro lado, a refrigeração dos produtos após a colheita, durante o transporte e distribuição não é suficiente para controlar este grupo de patógeno (Buchanan & Doyle, 1997; Suslow, 1999).

A *Escherichia coli* O157:H7 é uma *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) que tem sido responsabilizada por surtos de toxinfecção alimentar devido à ingestão de alimentos insuficientemente cozidos e por transmissão pessoa-a-

pessoa (Diaz & Hotchkiss, 1996). Foi primeiramente reconhecida como colites hemorrágicas e gastroenterites, nos Estados Unidos, em 1982 (Chapman, 1995; Dorn, 1995; Johson et al., 1995; Diaz & Hotchkiss, 1996; Buchanan & Doyle, 1997; Chen et al., 1998; ICMSE, 1998; Bell & Kyriakides, 2000a; McIngvale et al., 2000). Está também associada com púrpura trombocitopênica trombótica (TTP) e síndrome urêmica hemolítica (HUS), ambas complicações das colites hemorrágicas. São enfermidades sérias com alta morbidade e mortalidade, (Chapman, 1995; Palumbo et al., 1995; Diaz & Hotchkiss, 1996; Chen et al., 1998).

Os principais sintomas incluem dores abdominais, diarreia sanguinolenta e edema da mucosa do cólon (Chapman, 1995; Diaz & Hotchkiss, 1996). Os sintomas podem ocorrer após um a dois dias de incubação, embora períodos maiores, de três a cinco dias, sejam informados. A enfermidade dura aproximadamente oito dias (Diaz & Hotchkiss, 1996; Buchanan & Doyle, 1997; Bell & Kyriakides, 2000a).

O gado tem sido apresentado como sendo a maior fonte de *E. coli* O157:H7 para humanos, enquanto outras possíveis fontes ainda não foram determinadas (Chapman, 1995; Del Rosário & Beuchat, 1995; Dorn, 1995; Bell & Kyriakides, 2000a). Entretanto, Hancock et al. (1997) esclarecem que ainda não foi demonstrado se o gado é um reservatório ou um hospedeiro incidental. A *E. coli* O157:H7 tem como "habitat" o solo e a água contaminados por material fecal e material em decomposição. Normalmente é isolada do intestino de suínos, aves e, especialmente do trato gastrointestinal de bovinos (Nascimento & Stamford, 2000).

Embora os alimentos de origem bovina sejam uma importante fonte de *E. coli* O157:H7, Chapman (1995) chamou a atenção para a sazonalidade dessas infecções, que parecem ocorrer comumente no verão. Segundo o autor, isto pode também refletir uma contaminação sazonal de frutos, hortaliças e saladas

vegetais como veículo, se a infecção for oriunda de plantações contaminadas.

Uma vez que a contaminação dos alimentos ocorre principalmente por contato com material fecal de animais contaminados ou com o contato com superfícies insuficientemente higienizadas, qualquer produto alimentício pode veicular essa bactéria. Dentre os alimentos mais incriminados em surtos destacam-se a carne bovina mal cozida, especialmente carne moída utilizada na preparação de hambúrgueres, leite cru e produtos lácteos fermentados, vegetais consumidos crus, como alface, espinafre e repolho, molhos para saladas, maionese, cidra e suco de maçã não pasteurizado (Chapman, 1995; Del Rosario & Beuchat, 1995; Palumbo et al., 1995; Diaz & Hotchkiss, 1996; Buchanam & Doyle, 1997; Seo & Frank, 1999; Takeuchi & Frank, 2000; McIngvale et al., 2000).

Segundo Del Rosario & Beuchat (1995), em agosto de 1993 um surto de toxinfecção alimentar foi associado ao consumo de melão cantaloupe contaminado com *E. coli* O157:H7. Estudos realizados pelos autores para determinar a sobrevivência e características de crescimento desta bactéria em melões cantaloupe e melancias, frescos, cortados em cubos, mostraram que os frutos inoculados mantidos a 25°C apresentaram um aumento significativo na população de *E. coli* O157:H7, entre quatro a seis horas de incubação. As populações continuaram aumentando significativamente a cada análise, atingindo 6,81 log₁₀ UFC g⁻¹ em melões cantaloupe e 8,51 log₁₀ UFC g⁻¹ em melancias, após 28 horas de incubação. Já para os frutos mantidos a 5°C, o número de células viáveis de *E. coli* O157:H7 não apresentou mudanças significativas durante as 34 horas do período testado.

Estudos realizados para determinar a capacidade de sobrevivência da *E. coli* O157:H7 em alface fatiada, armazenada sob atmosfera modificada, foram realizados por Diaz & Hotchkiss (1996). Os autores observaram que a taxa de crescimento de *E. coli* O157:H7 foi elevada nas condições analisadas, embora o

crescimento de mesófilos não tenha sido afetado pelas condições atmosféricas. Isto é, tanto as amostras mantidas sob AM como aquelas sob atmosfera natural, apresentaram taxas de crescimento semelhantes. Ao comparar a taxa de crescimento com a manutenção das características organolépticas do produto durante o período de estocagem, verificaram que a alface fatiada, contaminada com *E. coli* O157:H7 e exposta a temperaturas abusivas, pode tornar-se um veículo para o patógeno, ao mesmo tempo que mantém as características de aceitabilidade para o consumo.

Seo & Frank (1999), observando a fixação da *E. coli* O157:H7 verificaram que as bactérias aderidas na superfície intacta das folhas de alface exibiam pequena penetração. Entretanto, quando estas folhas eram fatiadas e submersas numa suspensão contendo a bactéria, elas fixaram-se preferencialmente nos tecidos que na superfície intacta das folhas. Isso indica que a disponibilidade de nutrientes do exsudato favoreceu esta fixação. Resultados similares foram também observados por Takeuchi & Frank (2000) em pesquisa realizada para caracterizar o efeito do número do inóculo e temperatura na distribuição da *E. coli* O157:H7 em folhas de alface. Os autores identificaram também o mecanismo pelo qual estas bactérias são protegidas do tratamento com cloro, demonstrando que embora o tratamento com o produto tenha reduzido significativamente a fixação da bactéria na superfície e tecido das folhas de alface, grande número de células viáveis ainda permaneceu fixados.

Escherichia coli O157:H7 é reconhecida como cepas anaeróbicas, facultativas, mesófilas, que crescem bem em pH próximo ao neutro. Não são capazes de utilizar o sorbitol; são β -glucuronidase negativas e têm dificuldade de se multiplicar ou não se multiplicam nas temperaturas de 44,5°C utilizadas nas pesquisas de rotina de *E. coli* em alimentos (Nascimento e Stamford, 2000).

Pesquisas recentes mostram que estas cepas são mais resistentes que a *E. coli* padrão para condições de desidratação, congelamento e meio ácido. Foi

observado que o estresse ambiental que geralmente inativa a *E. coli* convencional é melhor tolerado pela *E. coli* O157:H7 (Suslow, 1999).

O envolvimento da *E. coli* O157:H7 em surtos de toxinfecções alimentares ocasionados pelo consumo de alimentos ácidos, como cidra e suco de maçã, salsicha fermentada, iogurte e maionese, desperta a atenção para a propriedade de resistência ao meio ácido por este patógeno. Berry & Cutter (2000), pesquisando o efeito e adaptação da *E. coli* O157:H7, quando exposta ao ácido acético utilizado para desinfecção de carcaças, notaram que grandes populações de cepas ácido-adaptadas permaneceram na carne após tratamento com 2% de ácido acético. Estas permaneceram durante quatorze dias de estocagem a 4°C, quando comparadas a cepas não adaptadas ao meio ácido. Estes dados indicaram que a adaptação da *E. coli* O157:H7 a condições de acidificação do meio pode influenciar negativamente na efetividade do uso de soluções ácidas para redução do número desses organismos em carcaças.

A capacidade de sobrevivência de *E. coli* O157:H7 é documentada por McIngvale et al. (2000) numa faixa de pH de 4,5 a 9,0, com ótimo de 7,0. Os autores esclarecem que a sobrevivência em alimentos ácidos é favorecida por baixas temperaturas de estocagem (<10°C) e que a *E. coli* O157:H7, além de ser resistente a muitos tratamentos usados no processamento de alimentos, tolera altas concentrações de cloreto de sódio, como 8,5%, assim como é capaz de sobreviver na presença de nitratos (70ppm).

A ampla capacidade para sobrevivência e proliferação em esterco animal composto é uma característica que só recentemente começou a ser avaliada (Hancock et al., 1997; Suslow, 1999; Gagliardi & Karns, 2000). Assim, as práticas agrícolas que utilizam esses melhoramentos orgânicos requerem novas orientações e monitoramento no seu uso contínuo, a fim de assegurar a qualidade sanitária dos produtos. Esta advertência serve também para a contaminação da água de irrigação com dejetos humanos e animais, ou

atividades de manuseio e processamento higienicamente inadequadas, considerando que estas estão primariamente relacionadas com o risco de surtos documentados e a sobrevivência e crescimento de patógenos entéricos em produtos de origem vegetal.

Essas condições inadequadas de produção são agravadas quando temperaturas elevadas são praticadas nos locais de distribuição, manuseio, e preparo de alimentos, em cadeias de serviços de alimentação e residências.

Um importante componente de sua virulência é a produção de uma ou ambas as toxinas Shiga-semelhante (SLT), I ou II (Bettelheim, 1998). Toda cepa EHEC produtora de Shiga toxina I (STx1) e/ou Shiga toxina II (STx2), pode também ser referida como verocitotoxina 1 (VT1) e verocitotoxina 2 (VT2), (Bettelheim, 1995; Palumbo et al., 1995; Buchanam & Doyle, 1997; Chen & Griffiths, 1998;). De acordo com Buchanam & Doyle (1997), a habilidade de produzir SLT foi adquirida de um bacteriófago, presumivelmente direta ou indiretamente da *Shigella*.

Pesquisas confirmam uma estreita associação entre a produção de verocitotoxina e enterohemólise entre as cepas EHEC pertencentes ao sorogrupo O157:H7, assim como de outros sorogrupos incluindo O111 e O116 (Bettelheim, 1995). Isto indica que a toxina sozinha não é suficiente para tornar a *E. coli* patogênica (Bettelheim, 1995, 1998; Buchanam & Doyle, 1997).

Segundo Buchanam & Doyle (1998), para que a *E. coli* seja considerada patogênica, é requerida a presença de outros marcadores de virulência.

A influência da temperatura de crescimento e produção de verocitotoxina por cepas de *E. coli* tem sido estudada por diversos autores. Contudo o controle de patógenos em alimentos crus é tradicionalmente dependente da conservação sob baixas temperaturas (<10°C) e estudos comprovam que cepas de *E. coli* podem crescer e formar toxinas estáveis em alimentos sob refrigeração (Palumbo et al., 1995; McIngvale et al., 2000).

Estudos realizados por McIngvale et al. (2000) indicam que, embora a baixa temperatura de estocagem afete a sobrevivência das bactérias ácido-láticas, não pareceu afetar a sobrevivência de *E. coli* O157:H7. Estes resultados foram respaldados por outros autores, que demonstram a elevação no número de *E. coli* O157:H7 quando submetidas a condições de baixa acidez e inanição, sob baixas temperaturas de estocagem (5°C), quando comparadas a estocagem sob temperaturas mais elevadas (Splittstoesser et al., 1980; Del Rosario & Beuchat, 1995; Palumbo et al., 1995; Hotchkiss, 1992; Takeuchi & Frank, 2000).

Estudos realizados por Palumbo et al. (1995) comprovaram que algumas cepas de *E. coli* foram capazes de crescer e produzir verocitotoxina em BHI (caldo de enriquecimento de cérebro e coração) sob temperaturas tão baixas quanto 10°C e tão altas como 49°C.

Buchanam & Doyle (1997) esclarecem que a sobrevivência, o crescimento e a produção de toxina por *E. coli* O157:H7 depende da interação de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, principalmente da temperatura, pH e atividade de água. Os autores indicam que a temperatura mínima de crescimento é de aproximadamente 8 a 10°C, e faixa de pH entre 5,5 e 7,5, podendo crescer lentamente em valores mais baixos. O pH mínimo para crescimento é apresentado pelos autores como sendo entre 4,0 e 4,5. Sobre o efeito da atividade de água, consideram que a *E. coli* O157:H7 possui similaridade com outras *E. coli*, destacando apenas sua maior resistência aos efeitos do cloreto de sódio. Por outro lado, com exceção dos nitratos, a *E. coli* O157:H7 não parece ter aumentado sua resistência para aditivos antimicrobianos de alimentos (Buchanam & Doyle, 1997; McIngvale et al., 2000).

A atividade de β -glucuronidase é descrita como restrita para espécies entre os gêneros *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella*. Esta propriedade foi usada pela primeira vez para identificar *E. coli* isoladas da água, (Heizmann et al., 1988). Posteriormente, foi incorporado ao meio 4metilumbeliferil- β -D-

glucuronídio (MUG) como um substrato fluorescente em ágar. Estas colônias puderam assim ser detectadas sob luz UV (366 nm) pela fluorescência azul do 4-metilumbeliferil.

Segundo Queiroz et al. (1990), toda cepa *E. coli* enteroinvasiva descrita não descarboxila a lisina e não possui motilidade, exceto algumas cepas dos sorogrupos O124 e O144, que são móveis. O sorogrupo O, ao qual a *E. coli* enteroinvasiva pertence, foi gradativamente expandido e agora inclui O28ac, O29, O112ac, O136, O144, O152, O164 e O167. De acordo com Gross et al. (1983), o reconhecimento de novos sorogrupos enteroinvasivos facilita a determinação epidemiológica das doenças diarréicas causadas por *E. coli* enteroinvasivas (EIEC).

Alguns alimentos podem oferecer risco potencial para ocasionar surtos de toxinfecção alimentar por *E. coli*. Na maioria das vezes, esses surtos são consequência de falha no sistema de controle para identificar o fator coadjuvante do surto. Bell & Kyriakides (2000a) acreditam que a evidência dos surtos recentes que estabelecem uma conexão com uma dose infectiva baixa necessária para produzir enfermidades associadas com a *E. coli* O157:H7, produtora de verocitotoxina, demonstra claramente a necessidade de emprego de medidas eficazes para evitar a presença deste organismo na indústria e conseqüentemente, que esta encontre-se presente no momento de consumo.

De acordo com Chapman (1995), a colonização da *E. coli* O157:H7 no gado leiteiro e de corte exige uma rigorosa observação nas práticas agrícolas e de produção de rebanhos para identificar a ecologia e epidemiologia do organismo. Assim podem-se determinar medidas que a venham reduzir a colonização e, conseqüentemente, o risco para o consumidor. O autor afirma que, reduzindo o número de animais portadores de VTEC O157, estará efetivamente penetrando na cadeia alimentar e interferindo na disseminação da bactéria. Neste caso, a análise de perigos e realização de controle de pontos

críticos identificados, assim como as boas práticas de manuseio e fabricação, inspeção mais rigorosa nos abatedouros e descontaminação de carcaças e produtos vegetais, incluídos nos programas APPCC, possibilitarão um maior controle da infecção e segurança dos produtos alimentícios.

Os dados publicados em pesquisas sobre o crescimento e sobrevivência da *E. coli* O157:H7 em produtos vegetais alertam para as condições de temperatura nos principais locais de manuseio, distribuição, comercialização e consumo desses produtos. Um sistema amplo de prevenção e programas de monitoração de risco nas fazendas e hortas, incluindo um tratamento de higiene e sanificação durante a colheita e pós-colheita, são componentes adicionais importantes de um programa APPCC completo.

A *E. coli* O157:H7 é sensível ao cloro, ozônio e outros desinfetantes desde que haja contato físico do agente sanificante com a célula bacteriana (Suslow, 1999). Assim, a efetividade do sanificante para tratamento vegetal provavelmente depende da habilidade e atividade do agente para entrar em contato com o microrganismo. Seo & Frank (1999) alertam que, embora a cloração seja um método largamente usado para desinfecção de produtos vegetais, e o ácido hipoclorito seja um potente agente bactericida, a lavagem de vegetais com cloro não remove ou inativa a bactéria no produto fresco, quando esta penetra os tecidos vegetais em locais que a protegem dos efeitos do cloro.

Embora não ofereça completa segurança, a desinfecção é um processo essencial nas práticas de sanificação de "containers", superfícies de contato, equipamentos e utensílios, lavagem de frutos e hortaliças pós-colheita para remoção da terra e muitos contaminantes indesejáveis da superfície.

2.5.2 *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é composto por mais de 2.700 sorotipos. Animais e aves são apontados como os reservatórios naturais. A maioria se encontra no trato intestinal do homem ou animais, como patógenos ou como comensais.

Gênero da família *Enterobacteriaceae* se caracteriza como bactérias Gram negativas, aeróbias e anaeróbias facultativas, de forma bacilar, não formadoras de esporos. As formas móveis possuem flagelos peritricos. São capazes de produzir ácido e, às vezes gás, a partir da fermentação da glicose, mas não fermentam a lactose. Podem ser catalase positiva e oxidase negativa e reduzem nitratos a nitritos (Mossel & Garcia, 1983; Frazier, 1985; Jay, 1994; Beuchat, 1996; ICMSF, 1998).

A maioria das cepas utiliza o citrato como única fonte de carbono. Descarboxilam a lisina, a ornitina e a arginina, e produzem sulfato de hidrogênio. Produzem reação positiva do vermelho de metil e prova de Voges-Proskauer e indol negativas. Não desaminam a fenilalanina nem hidrolizam a uréia (Foster, 1969; Mossel & Garcia, 1983; ICMSF, 1998).

A classificação e nomenclatura das salmonelas sofreram, durante os últimos anos, algumas modificações, estando atualmente baseada em suas características bioquímicas. Assim, segundo Campos (1999), o gênero *Salmonella* está dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, estando a primeira subdividida em seis subespécies. Ainda informa o autor que esta divisão em espécies e subespécies tem pouca importância prática em medicina e epidemiologia. A utilização do esquema de identificação de Kauffmann & While, que divide o gênero em tipos sorológicos (sorotipos ou sorovares), tendo como base a composição antigênica com relação aos antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar), é de maior interesse nas análises de rotina.

Salmonella enterica sorotipo *Enteritidis* fagotipo 4 (PTA) e *S. enterica* sorotipo *Thyphimurium* definitivo fagotipo 104 (DT104) são os dois mais prevalentes sorotipos isolados de infecções humanas. Juntos, ocorreram para aproximadamente 80% de todos isolados obtidos de 1990 a 1994 na Inglaterra e País de Gales (Mattick et al., 2000).

Inicialmente, as investigações indicaram que, tipicamente, para causar enfermidade nas pessoas adultas, era necessária a ingestão de 10^6 - 10^7 UFC g^{-1} do produto contaminado. Entretanto, a investigação de alguns surtos, especialmente quando o veículo foi a água ou alimentos gordurosos ou tamponados, foram encontradas doses $<100/g$ de *Salmonella* (ICMSF, 1998). A diferença na dose infectiva parece estar relacionada com a sobrevivência da bactéria durante o trânsito gastrointestinal e resistência individual. Por outro lado, as células de gordura protegem o microrganismo da ação dos ácidos do estômago (Logan, 1994; ICMSF, 1998).

Segundo Mossel & Garcia (1983), mesmo que a contaminação inicial dos alimentos seja pequena em termos quantitativos, são as condições como temperatura, umidade, pH e conteúdo em nutrientes, que irão permitir a multiplicação desse microrganismo e, assim, tornar real o risco de infecção.

A redução de água livre no alimento é um método estabelecido para ampliar a vida útil dos alimentos e controlar o crescimento bacteriano. A dessecação dos alimentos resulta na redução da atividade de água (a_w) e, conseqüentemente em menor atividade metabólica dos microrganismos. O crescimento ótimo das cepas de *Salmonella sp.* ocorre em a_w de 0,99, mas esta bactéria tolera muitas condições de estresse e pode sobreviver em baixas atividades de água por longos períodos (Mattick et al., 2000).

Pesquisas recentes revelaram que a virulência da *Salmonella* entérica sorotipo *Enteritidis* PT4, em animal infectado oralmente, está relacionada a grande tolerância a uma série de condições de estresse. Em estudo realizado para investigar a sobrevivência e mudanças morfológicas de cepas de *Salmonella* entérica sorotipo *Enteritidis* PT4 e *Salmonella* enterica sorotipo *Typhimurium* DT104 em baixa atividade de água, Mattick et al. (2000) observaram que todas as cepas de *Salmonella* testadas puderam sobreviver por longo período a valores reduzidos de a_w . Muito embora a sobrevivência tenha sido maior numa

atividade de água de 0,99. Quando concentrações de 8% de NaCl ($a_w = 0,95$), 96% de sacarose ($a_w 0,94$), e 32% de glicerol ($a_w 0,92$) foram utilizadas no meio, estas a_w usualmente tiveram efeito bactericida para as células de *Salmonella*. Entretanto, isso também dependeu do meio de cultivo utilizado e da temperatura de incubação. Os autores informam que a a_w mínima observada para crescimento de *Salmonella* foi de 0,95 quando o NaCl era o agente bactericida e de 0,924 quando usaram o glicerol. Com relação à temperatura, em incubação a 37°C ocorreu perda mais rápida de viabilidade que quando incubadas a 21°C, nos valores considerados letais de a_w .

Foi também relatado que a dose infectiva para *Salmonella* é reduzida (ex. de 10 para 100 células) quando o organismo está presente em alimentos com baixa atividade de água. Possivelmente isto ocorre após estresse osmótico subletal, o qual tem aumentado o interesse sobre a sobrevivência da bactéria nestas condições (Logan, 1994; Mattick et al., 2000).

A contaminação de alimentos ocorre em vários estágios da cadeia alimentar, desde o cultivo até o processamento ou mesmo até chegar à mesa do consumidor. A poluição do meio ambiente durante o cultivo e as condições higiênicas inadequadas durante o manuseio e processamento aumentam consideravelmente o risco de contaminação por esses patógenos. Muitas vezes, a contaminação de vegetais ocorre durante as práticas agrícolas de irrigação e/ou fertilização do solo. A utilização de águas poluídas, esterco animal ou sedimentos de dejetos são citados como as principais fontes deste e de outros patógenos toxígenos nestes produtos (Hancock et al., 1997; Suslow, 1999; Gagliardi & Karns, 2000).

A transmissão de indicadores fecais em plantas cultivadas com água não tratada e fertilização orgânica tem sido apontada como fator importante para presença de *Salmonella sp.* em vegetais, estando correlacionada com a presença de *Escherichia coli* (Nguyen-the & Carlin, 1994).

O risco de contaminação de vegetais durante a colheita e processamento está também associado à habilidade deste patógeno para sobreviver no solo (Nguyen-the & Carlin, 1994). A presença de manipuladores infectados nas linhas de produção e preparo de alimentos é apontada como agravante na disseminação e infecção por *Salmonella* (Brackett, 1994; FDA, 1998; Hobbs, 1999).

Alguns casos de sobrevivência de *Salmonella* por mais de duzentos dias no solo são citados. Mas, muitos experimentos informam que estas desaparecem em poucos dias, se eliminada a fonte primária de contaminação (Nuguyen-the & Carlin, 1994; ICMSF, 1998).

Investigações de produtos frescos, refrigerados ou não, revelam a presença de alguns sorotipos de *Salmonella* capazes de ocasionar infecção humana. Aves, produtos cárneos, ovos e produtos lácteos são mais comumente incriminados em surtos que os produtos vegetais, (Beuchat, 1996).

Embora frutos e hortaliças frescos não estejam implicados freqüentemente, surtos são documentados atribuídos aos produtos vegetais crus utilizados como ingredientes de saladas ou saladas de frutas.

Em um surto registrado em Curitiba, PR, foi confirmada a presença de *Salmonella Enteritidis* como agente da toxinfecção alimentar resultante da ingestão de salada de maionese contaminada (Mota et al., 1983). Dados obtidos de surtos de salmonelose ocorridos em uma cantina escolar, no município de São Paulo, SP, em 1991, indicaram que o alimento veiculador da enfermidade foi a salada de maionese (Piccolo et al., 1992) . No primeiro caso houve indícios de que a contaminação foi ocasionada por um portador responsável pela manipulação e fracionamento dos produtos. No segundo caso, foi decorrente de contaminação cruzada da salada pela presença de frango cru contaminado com o agente. Fato é que a presença de *Salmonella* no local de preparo dos alimentos que foram servidos sem sofrerem qualquer processo de cocção promoveu um

meio propício para disseminação do agente que ocasionou a infecção.

A alface é um alimento de contaminação considerável por bactérias entéricas. Isso ocorre porque estas bactérias são largamente distribuídas, desde os locais de plantio e colheita e são disseminadas através do processo de preparação para o consumo final. É também um ingrediente comum na preparação de saladas, sanduíches e ornamentação de pratos. Devido à contaminação fecal, por dejetos humanos e/ou animais no solo e irrigação com água poluída, a alface é um portador potencial de microrganismos patógenos como *E. coli* e *Salmonella*. Maxcy (1982) verificou como o suco de alface pode representar um meio de cultura apropriado para o crescimento de uma microbiota contaminante. Utilizando suco de alface irradiado para eliminação da microbiota acompanhante e suco não irradiado como controle, inoculou cepas conhecidas de *E. coli*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* como contaminantes simulados. Observou que esses microrganismos cresceram bem a 32°C no suco com concentração de 2:1. *E. coli* e *S. Enteritidis* cresceram também no suco com concentração de 4:1, mas *S. Typhimurium* manteve-se estável por 48 horas. No suco fresco incubado a 20°C por cerca de 24 horas, com ou sem inóculo de aproximadamente 10^4 UFC ml⁻¹ de *S. Typhimurium*, um grande aumento na população deste agente foi determinado quando comparado à microbiota normal do suco. Esses resultados indicam que contaminantes patogênicos, quando em contato com o exsudato das folhas de alface rasgadas, pode encontrar um meio propício para crescimento.

Em pesquisa realizada por Magnuson et al. (1990), em alface parcialmente processada, foi verificado que a maioria, cerca de 95%, das bactérias isoladas foram bastonetes Gram negativos. Embora os autores não tenham obtido identificação positiva para *Salmonella*, alertam que patógenos humanos tais como *Salmonella* e *Shigella* foram isolados de alfaces frescas por outros autores. Outras pesquisas realizadas com produtos vegetais, como

berinjela, couve-flor, pimenta, escarola, alface, alcachofra, aipo, repolho, salsa, espinafre, etc. oriundos de fazendas, do comércio atacadista e do varejo, supermercados e pequenos mercados de frutos e hortaliças, foram reportadas por Beuchat (1995) onde *Salmonella sp.* foi detectada.

Embora a penetração de microrganismos potencialmente patogênicos no interior de frutos e hortaliças seja prevenida por uma barreira física, Madden (1992) alerta que o processamento mínimo destrói esta barreira, tornando os nutrientes disponíveis para utilização dos microrganismos. Por causa dessas mudanças fisiológicas e metabólicas em frutos e hortaliças minimamente processados, estes produtos têm sido considerados como potencialmente perigosos pelo Food and Drug Administration (FDA, 1998).

A habilidade da *Salmonella sp.* para crescer no interior dos tecidos de melões cantaloupe e honeydew, e de melancias, foi investigada por Golden et al. (1993). Pedacos de melões descascados, pH entre 5,9 a 6,67 e caldo Tryptic Soy (TSP), pH 5,9, foram inoculados com uma mistura de cultura na proporção de aproximadamente 100 UFC g⁻¹, contendo partes iguais de cinco espécies de *Salmonella*. Foram incubados por 24 horas a 5°C ou 23°C, seguido de cultivo por plaqueamento em superfície em agar entérico HeKtoen. Os resultados indicaram rápido crescimento de *Salmonella* nos melões e em TSB a 23°C, sendo que a população final nas melancias foi 1,0 log₁₀ maior que as determinadas em melões cantaloupe e honeydew, assim como em TSB. Os autores informam que, embora as populações viáveis da bactéria não tenham aumentado durante as 24 horas de incubação à 5°C, pouca ou nenhuma redução foi observada.

O controle das matérias-primas para ração animal, a redução da contaminação ambiental por dejetos humanos e animais, a higiene animal, o uso de água potável para irrigação, técnicas de manuseio e processamento sanitariamente seguras, assim como o controle de saúde dos manipuladores de alimentos, são medidas estabelecidas para a redução de portadores humanos e

animais deste patógeno. Conseqüentemente, previne-se a infecção alimentar (Mossel & Garcia, 1983; Hancock et al., 1997; Hobbs, 1999; Suslow, 1999; Gagliardi e Karns, 2000).

Shapiro et al. (1999) acreditam ser imperativo, para o manuseio de alimentos, conhecer como estes devem ser corretamente preparados para evitar o risco de contaminação originário de produtos animais crus. Isto porque a maioria dos surtos está relacionada ao consumo destes produtos ou decorrente de contaminação cruzada em locais de preparo e distribuição de alimentos oferecidos crus para o consumo.

Medidas preventivas para controle da salmonelose são aconselhadas pelo "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC, 1999) como: 1) tratamento de águas para suprimento municipal; 2) melhoramento das condições higiênicas das fazendas, dos abatedouros de aves e animais, e nas operações de colheita, processamento e embalagem de frutos e hortaliças; 3) aperfeiçoamento e educação sanitária de trabalhadores das indústrias de alimentos e fazendas de produção, com base na segurança dos alimentos; 4) procedimento de inspeção e controle em restaurantes, lanchonetes, "fast-food", etc., para prevenir a contaminação cruzada e erros de manuseio de alimentos que podem levar a surtos; 5) ser particularmente cuidadoso com alimentos preparados para crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas; 6) observar o tempo e temperatura de cocção para frango, carne moída, carne assada, ovos, etc. e não comer ou beber alimentos contendo ovos crus ou leite sem pasteurizar.

2.5.3 *Staphylococcus aureus*

A taxonomia dos estafilococos tem sofrido mudanças importantes nos últimos 20 anos. Na edição do Manual Bergey's, de 1986, se admitiam dezenove espécies de estafilococos, sendo que nos últimos anos são consideradas mais de trinta espécies (ICMSF, 1998; Martins, 1999; Gay & Fox, 2001).

Staphylococcus aureus é a espécie do gênero *Staphylococcus* que se

apresenta em forma de cocos Gram-positivos não esporulados, catalase e coagulase positivos, que se dividem em mais de um plano para formar racimos tridimensionais de células denominados "cachos de uva". Do ponto de vista morfológico, os estafilococos são parecidos ao gênero *Micrococcus*. Em contraposição ao metabolismo respiratório estritamente aeróbio dos micrococcos, crescem em anaerobiose e mostram um metabolismo de anaeróbio facultativo. A diferenciação entre as espécies está amparada pela homologia do DNA e por estudos imunológicos. A diferenciação e caracterização entre as espécies se baseiam em provas bioquímicas e em padrões de resistência. O *S. aureus* pode se dividir em vários biotipos e ecotipos. Além disso, pode ser classificado de acordo com o fagotipo e sorotipo, análise dos plasmídios e mediante ribotipo (ICMSF, 1998; Pereira et al., 2000).

O método clássico para contagem e diferenciação dos estafilococos é recomendado por vários autores (Mossel e Garcia, 1983; APHA, 1992; Silva et al., 1997) através do uso do ágar de Baird-Parker, considerando que seus agentes inibitórios, telurito, glicina e cloreto de lítio, são eficientes para selecionar *S. aureus* e a gema de ovo adicionada ao meio permite a regeneração das células injuriadas além de facilitar a diferenciação por meio da hidrólise da lipovitellina presente (Stiles & Ng, 1981; ICMSF, 1983; Mossel & Garcia, 1983; APHA, 1992; Baird & Lee, 1995; Silva et al., 1997). Porém, algumas cepas de *S. aureus* não manifestam esta característica e muitas vezes são também produtoras de toxinas (Iaria, 1981; ICMSF, 1985; Park et al., 1992).

As provas mais frequentes para diferenciar *S. aureus* de outros estafilococos são as de coagulase (coagulação do plasma sanguíneo) e termonuclease (destruição do DNA pela nuclease que resistiu à ebulição) (Sperber & Tatini, 1975; Chang & Huang, 1995; Su & Wong, 1997; Gay & Fox, 2001). Entretanto, nenhuma destas provas é absolutamente específica, uma vez que outras espécies de estafilococos podem produzir quantidades pequenas

de coagulase. Por isso, se recomenda a utilização de outros dispositivos de identificação bioquímica, como o sistema API Staph-Ident, Bactident Staphy plus e prova do fator de agregação (prova de coagulase em lâminas) para determinar os produtores eficazes de coagulase (ICMSF, 1998; Pereira et al., 1999; Sharma, 2000). A produção de proteína A foi considerada, por Chang e Huang (1995), como a melhor marca de *S. aureus* enterotoxigênico, apresentando 100% de sensibilidade e 96,8% de especificidade nas cepas analisadas.

Quando o crescimento do *S. aureus* é permitido no alimento, este pode produzir toxina e, embora a bactéria seja destruída pela cocção, a toxina produzida é termoestável e não pode ser destruída pelo calor. Estas toxinas são resistentes à fervura por 60 minutos, podendo manter-se ativas até quando submetidas a autoclavação, a 120°C, por 20 min.

Segundo Pereira et al. (1999), a propriedade de termorresistência constitui ponto crucial para o controle de qualidade dos alimentos, uma vez que a enterotoxina pode persistir no produto final, após o processamento, conseqüentemente oferecendo grande perigo de toxinfecção.

O crescimento de cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* em cerca de 10^6 ou mais células por grama de alimento é geralmente considerado necessário para que haja produção de toxinas em quantidade suficiente para causar intoxicação se o alimento for consumido (Bergdoll, 1990; Park et al., 1994).

De acordo com Park et al. (1994), uma pequena dose de enterotoxina estafilocócica (SE), cerca de 100 a 200 ng/g, pode produzir sintomas de toxinfecção.

Vários métodos sensíveis são empregados para detecção de SE. As provas biológicas clássicas para detecção de toxinas estão baseadas na injeção intraperitonal de extratos de alimentos ou a administração intragástrica em cobaias. Por serem estas muito demoradas, vêm sendo substituídas por técnicas

mais sensíveis utilizando kits comerciais, capazes de detectar baixos níveis de enterotoxina no alimento de cerca de 1 a 2ng/g, como: (1) radioimunoensaio (RIA); (2) ensaio imunosorbante "enzima-ligada" monovalente (ELISA) ou soro polivalente (TECRA) que é mais rápido; (3) imunoensaio enzimático (EIA); (4) técnica de aglutinação com partículas de látex; (5) reversão passiva de aglutinação de látex (RPLA); e (6) RIDASCREEN, um kit comercial mais recente e pouca informação sobre sua eficácia está disponível (Bergdoll, 1990; Park et al., 1992, 1993, 1994; Tsen et al., 1995; Chang e Huang, 1995; Su & Wong, 1997; Pereira et al., 1999; Sharma et al. 2000). Embora todos os métodos sejam apropriados para o uso em laboratórios de rotina, a técnica de ELISA é mais moderna e mais confiável (ICMSF, 1998).

Para solucionar problemas de resultados falsos positivos para enterotoxina estafilocócica em produtos marinhos detectados nos kits TECRA. Park et al. (1993) realizaram testes utilizando três kits comerciais (ELISA monovalente, RPLA e TECRA) e verificaram que o kit TECRA apresentou pouca sensibilidade para certos alimentos marinhos, embora esta fosse similar aos outros testes usados. Os autores concluíram que as reações falso positivas foram causadas por substâncias produzidas por outros microrganismos que não eram *S. aureus*, tais como *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Outros ensaios "in vitro" ou "in vivo" vêm sendo utilizados na tentativa de reduzir o tempo e o custo destas provas, assim como aumentar sua sensibilidade e especificidade (Rasooly et al., 1997; Su & Wong, 1997).

A preocupação com a qualidade dos alimentos não só envolve os riscos de veiculação de doenças, como também as perdas econômicas oriundas das alterações microbianas. A redução da vida útil e depreciação do produto perante o consumidor geralmente estão associadas a matéria-prima de má procedência e condições de manipulação inadequadas (Bauman, 1974; Mossel & Garcia, 1983;

Brackett, 1994; Mohd-Som, 1994; Babic & Watada, 1996; Bennik et al., 1996).. Os manipuladores de alimentos estão sempre sendo apontados como vetores de *S. aureus*, se eles são portadores e exercem práticas inadequadas de higiene pessoal (Bolin et al., 1977; Iaria, 1981; Eiroa, 1989; Scoth, 1989; Cantwell, 1992; Ungar et al., 1992; Floros, 1993; Marth, 1998). Orofaringes humanas, pele, cútis e feridas superficiais são reservatórios comuns de *S. aureus* (Castro & Iaria, 1984; Gomes & Gallo, 1995; Carvalho & Serafini, 1996; Wagner Jr., 1999).

A partir de portadores ou pessoas com sinais de infecção, o *S. aureus* pode, por meio de mecanismos diversos, alcançar o vestuário, o mobiliário, os utensílios, os equipamentos, o ambiente, assim como os alimentos, nas áreas de produção, industrialização e preparo inclusive de cozinhas domésticas e hospitalares, e durante a comercialização. É importante destacar a presença de animais domésticos como uma fonte potencial de contaminação desse microrganismo. Uma vez presentes no alimento e havendo condições adequadas para seu desenvolvimento, essa bactéria multiplica-se rapidamente. Dependendo da cepa, pode haver produção de toxinas termoestáveis denominadas de "enterotoxinas estafilocócica", que podem acarretar distúrbios gastrointestinais. De acordo com Tsen et al. (1995), *S. aureus* com gene enterotoxigênico tem mostrado ser capaz de produzir uma ou mais de uma família de enterotoxinas. Enterotoxinas estafilocócicas (SE_s) estão classificadas como A (SEA), B (SEB), SEC (C₁, C₂ e C₃), D (SED) e E (SEE) (Bergdoll, 1990; Su & Wong, 1997). Alguns tipos de enterotoxina estafilocócica, segundo Sharma et al. (2000), foram distinguidos sorologicamente, bioquimicamente e por análise genética molecular e incidem em dois grupos: SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, os quais têm 66% a 98% da seqüência de aminoácidos identificados e SEA, SED, e SEE, os quais têm 53% a 81% identificados.

Hurst (1995) esclarece que uma das potenciais fontes de patógenos

bacterianos transferidos a produtos minimamente processados são os empregados que fisicamente dirigem as operações durante a preparação destes. Ao observar que os vegetais são sistematicamente desmantelados no processador, por cortes, retalhamento, descasque e fatiamento, verifica-se que este tipo de processamento pode originar um produto de qualidade comprometida. A manipulação adicional durante a lavagem, secagem e empacotamento, aumenta o risco de contaminação por patógenos.

Schlimme (1995) inclui o *S. aureus* entre outros patógenos passivos de contaminar os produtos MP pelo manuseio. Algumas vezes, esta contaminação é agravada pela manutenção do alimento a temperatura ambiente por longo período, permitindo, assim, a produção de toxina por esta bactéria.

Iaria et al. (1980) detectaram a presença de *S. aureus* enterotoxigênico em manipuladores de alimentos, em cozinhas hospitalares. Foi detectado em 35,3% do total de indivíduos examinados e, destes, 16,7% foram positivos para produção de enterotoxina estafilocócica tipo C (SEC). Pesquisa realizada por Castro e Iaria (1984) no vestibulo nasal de 78 manipuladores de alimentos que trabalhavam em cozinhas hospitalares de João Pessoa, PB, revelou também a presença de *S. aureus* em 42,3% dos portadores nasais. Em 6,4% destes foram isoladas cepas produtoras de toxina tipo B, C, AE, e ABE. Estudos também realizados por Carvalho & Serafini (1996) em trabalhadores do Restaurante Universitário da Universidade Federal de Góias/Brasil demonstraram que *S. aureus* e *S. epidermidis* foram isolados de 44 manipuladores de alimentos, sendo 26,08% isolados da região nasal, 21,73% das mãos e 34,70% da orofaringe.

É reconhecido internacionalmente que locais onde se prepara um grande número de refeições estão sujeitos à transmissão de microrganismos patógenos, entre estes *S. aureus*. Pelo fato de não haver obrigatoriedade de notificação da doença no Brasil, dados epidemiológicos são escassos, estimando-se que apenas 1% a 10% do número real de surtos sejam confirmados (Iaria, 1981; Eiroa,

1989; Park et al., 1992). Entretanto, em todas as etapas de produção de alimentos, o grande problema para o controle é representado pelo manipulador, cuja atuação no preparo do alimento não se pode evitar. As baixas noções de higiene, saúde deficitária e conhecimentos técnicos inadequados fazem destes os grandes vilões na determinação de doenças e deterioração de alimentos (Iaria, 1981; Mossel & Garcia, 1983; ICMSE, 1985; Park et al., 1992; Ungar et al., 1992). Assim, a vigilância a este nível requer o desenvolvimento de programas de educação sanitária especiais e um plano sanitário da planta de processamento. Durante transporte, armazenamento e comercialização as principais preocupações, além da higiene, devem estar voltadas para as condições de temperatura, umidade e ventilação recomendadas para cada classe de alimento (Wigginton, 1974; Bolin et al., 1977; Shewfelt, 1986; Bolin & Huxsoll, 1989; Huxsoll & Bolin, 1989; Babic & Watada, 1996; Bennik et al., 1996).

O diagnóstico rotineiro para *S. aureus* está baseado em testes pré-formados para fator coagulase, catalase, hemólise e desoxiribonuclease termoestável. Testes comerciais de aglutinação de látex e de biotipagem vêm sendo avaliados para identificação e diferenciação de *S. epidermidis* (Chang & Huang, 1995; Tsen et al., 1995; Foster, 2000; Gay & Fox, 2000). Foram divulgadas pesquisas sobre os subtipos de estafilococos isolados usando técnicas de tipificação molecular para detecção de enterotoxinas (Tsen et al., 1995).

Espécies de estafilococos coagulase negativos estão entre os mais importantes patógenos e sua identificação é também considerada importante para o diagnóstico preciso da etiologia de infecções estafilocócicas. O principal representante é o *Staphylococcus epidermidis*, embora muitas outras espécies do gênero sejam coagulase negativas e também patogênicas (Kotilainen et al., 1991).

A presença de estafilococos coagulase positivos foi observada por Splittstoesser (1973) em vegetais congelados. Muitas amostras apresentaram

resultados positivos para o microrganismo em 39% das amostras de ervilhas e feijões verdes, 31% das vagens cortadas e 64% de milho, embora as contagens médias fossem de apenas dez estafilococos por grama.

Segundo Pereira et al. (2000), estafilococos enterotoxigênicos são aqueles, em sua grande maioria, produtores de coagulase e representados por *Staphylococcus aureus*. Quando presentes no alimento em número suficiente, sintetizam enterotoxinas que, ao serem ingeridas, após incubação de uma a quatro horas, ocasionam sintomas de gastroenterites.

Embora nem todas as cepas de estafilococos que são coagulase positiva sejam *aureus*, o teste de coagulação de plasma (coagulase) é reconhecido como uma característica típica de *S. aureus*. Rotineiramente, é usado na sua identificação embora alguns resultados possam apresentar-se como falsos positivos (Gay e Fox, 2001). Testes de coagulase que apresentam reação menor que 4+ são, às vezes, considerados subjetivos (FDA, 2001). Entretanto, a AOAC (1990) considera que algum grau de formação de coágulo é uma reação positiva e APHA (1992) só reconhece como reações positivas atividade de coagulase $\geq 3+$. Testes realizados por Chang & Huang (1995) para determinar a atividade de coagulase em cepas de *S. aureus* demonstraram que o protocolo da AOAC apresentou uma sensibilidade de 97,7% e uma especificidade de 95,1% e pode ser completado com seis horas de incubação. É considerado, assim, mais prático que os métodos usados pela APHA e FDA.

A termonuclease (TNase) é também uma característica enzimática do *S. aureus*. Existem inúmeros testes para detecção e relação de crescimento de estafilococos com a presença de enterotoxina em alimentos, sendo considerados, muitas vezes, substitutos satisfatórios para o teste de coagulase (Neumayr & Krämer, 1990; Chang & Huang, 1995). A habilidade do *S. aureus* de crescer e produzir enterotoxina A e termonuclease foi determinada em meios contendo cinco hortaliças isoladas ou em combinação com BHI por Neumayr & Krämer

(1990). Eles observaram que, com exceção das amostras de feijão preto esterilizado, o crescimento de *S. aureus* foi excelente em todos os meios apresentando contagens $>10^8$ UFC g⁻¹ após 48 horas de incubação a 25°C, assim como produção de enterotoxina A (SEA) de 33 a 72 ng/ml em BHI.

Em contraste com os produtos de origem animal, o crescimento de *S. aureus* e a incidência de produção de enterotoxinas são baixos em vegetais, tais como ervilhas, feijão, espinafre, aipo, alface e nabo. Isto é decorrente da ação antagonista da microbiota normal presente em vegetais crus não tratados (Neumayr & Krämer, 1990). Beuchat (1996) afirma que isto decorre do fato de *S. aureus* não competir bem com outros microrganismos normalmente presentes em produtos frescos e saladas vegetais pré-preparadas e, provavelmente, seu crescimento precede o desenvolvimento pela microbiota não patogênica quando estes microrganismos se encontram em grandes números no produto.

Silva Jr. et al. (1994), observando a capacidade do *S. aureus* se reproduzir em vegetais embalados a vácuo, notaram que houve diminuição no número de cepas cultivadas nas amostras. Concluíram os autores que provavelmente isto ocorreu devido à competição metabólica causada pela presença de *Escherichia coli*, quando as amostras foram mantidas à temperatura ambiente. Entretanto, o mesmo não foi observado quando a estocagem realizou-se sob refrigeração. Corlett (1989) e Hurst (1995) já alertavam para o risco do produto MP, quando mantido a 7°C ou temperaturas superiores durante a estocagem e/ou distribuição, favorecer o crescimento de patógenos toxigênicos como *S. aureus*,

A ocorrência de *S. aureus* potencialmente toxigêno em vegetais frescos minimamente processados nos Estados Unidos, com incidência de 3% a 14% de amostras positivas, é também citada por Nguyen-the & Carlin (1994). Em pesquisa realizada com brócolis MP embalados sob atmosfera modificada e estocados à temperaturas de refrigeração, Mohd-Som et al. (1994) não

detectaram *S. aureus*. Contudo, consideraram que a presença de cocos Gram positivos nas amostras pode ter alguma importância, considerando que seu percentual foi maior nas amostras embaladas que nas amostras frescas não embaladas.

Embora a presença de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico não seja objeto de grande número de pesquisas realizadas em produtos vegetais, vale ressaltar que a intensa manipulação sofrida por produtos hortícolas minimamente processados torna-os potencialmente perigosos à saúde do consumidor. Isto porque este agente, estando presente num ambiente onde a competitividade com a microbiota epífita foi amenizada, pode alcançar índices elevados e produzir toxinas, ocasionando então surto de toxinfecção alimentar.

2.5.4 *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* está incluído na classificação dos bacilos do Grupo I, definidos por terem um esporângio que não está deformado pelo esporo. Dentro do grupo, é feita a divisão em espécies com base no diâmetro da célula. Nas espécies de células grandes, em que estão incluídos os *B. cereus* com diâmetro $\geq 9\mu\text{m}$. Os demais bacilos grandes deste grupo são *B. megaterium*, *B. anthracis*, *B. mycoides* e *B. thuringiensis* (Vasconcellos & Rabinovitch, 1995; ICMSF, 1998; Helgason et al., 2000; Kim et al., 2000).

São bastonetes longos, Gram positivos, esporulados, aeróbios facultativos, com motilidade variada, produtores de toxina. Crescem na faixa de temperatura entre 10 e 40°C, tendo ótimo de 30°C; uma atividade de água mínima entre 0,92 e 0,95 e faixa de pH para crescimento entre 4,9 e 9,3. O *Bacillus cereus* encontra-se bastante difundido na natureza, sendo isolado com facilidade do solo, poeira, água doce e sedimentos, hortaliças, grãos e cereais, e do pêlo dos animais. Conseqüentemente, não é surpreendente encontrá-los no interior ou superfície de praticamente todos os produtos agrícolas e em muitos

alimentos naturais frescos, secos ou tratados industrialmente (Mossell & Garcia, 1983; Frazier, 1985; Harmon & Kautter, 1991; Fermanian et al., 1994; Jay, 1994; Vasconjcellos & Rabinovitch, 1995; ICMSF, 1998; Notermans & Batt, 1998; Helgason et al., 2000; Kim et al., 2000).

Trabalhos citados revelam que a incidência de *B. cereus* em alimentos é muito alta. Eles estão presentes em 52% de 1546 ingredientes alimentícios analisados, 44% de 1911 pratos de cremes e sobremesas, 52% de 431 produtos cárneos e vegetais, além de ser um contaminante freqüente do leite e produtos lácteos, especialmente leite em pó integral e desnatado, e inclusive leite submetido ao tratamento UHT (48%) (Gilbert et al., 1974; Delazari et al. 1978; Rodriguez & Barret, 1986; Beecker et al., 1994; Fermanian et al., 1994; ICMSF, 1998; Kim et al., 2000).

De acordo com Notermans & Batt (1998), todo tipo de alimento no qual o *B. cereus* for isolado e onde o manuseio ou o armazenamento permitiu sua multiplicação, deve ser considerado veículo potencial para toxinfecção alimentar. Uma avaliação da dose-resposta deve ser efetuada se os dados epidemiológicos estiverem disponíveis para caracterização do perigo e provê uma estimativa da natureza, da severidade e da duração dos efeitos adversos associados ao consumo do *B. cereus* e suas toxinas. Devido à sua estabilidade, deve ser considerado como um agente perigoso quando encontrado no alimento. A caracterização de perigo envolve uma avaliação qualitativa e/ou quantitativa da natureza dos efeitos adversos associados com o *B. cereus* e suas toxinas.

Em circunstâncias normais, o *B. cereus* encontra-se nos alimentos em concentrações $<10^3 \text{ g}^{-1}$ e quase sempre $<10^2 \text{ g}^{-1}$. Nesses índices, o organismo pode ser considerado inócua, já que a concentração mínima necessária para causar enfermidade é estimada em $>10^5 \text{ g}^{-1}$ (Hobbs & Gilbert, 1974; ICMSF, 1998). De acordo com Rodriguez e Barrett (1986), quando o *B. cereus* está presente em pequeno número no produto, pode dificultar a sua detecção entre a

microbiota normal. Entretanto, este número pode ser suficiente para eventual proliferação e produção de toxina no produto. Segundo Charni et al. (2000), é impossível para a indústria de alimentos excluir o *B. cereus* de seus produtos. Como demonstram vários estudos, os esporos de *B. cereus* podem sobreviver ao processamento térmico e assim crescerem em alimentos sob condições de refrigeração (Gilbert et al., 1974; Rodriguez & Barrett, 1986; Fermanian et al., 1994; Mahakarnchanakul & Beuchat, 1999). Certas cepas podem crescer em temperaturas tão baixas quanto 4 a 6°C (Charni et al., 2000).

A variação na dose infecciosa calculada varia de 1×10^3 até 1×10^{10} *B. cereus* g^{-1} de alimento, com um valor mediano de $1 \times 10^7 g^{-1}$ (Notermans & Batt, 1998). Esta grande variação tem uma relação valiosa com a dose-resposta e sua grande estabilidade. A taxa de exposição mostra que, frequentemente, os seres humanos estão expostos a altos números de *B. cereus*. Segundo ainda os autores, doses presentes nos alimentos de $\geq 1 \times 10^4$ *B. cereus* g^{-1} do produto devem ser consideradas como perigosas.

A patogenicidade do *B. cereus* é indicada pela presença de uma enterotoxina, embora três fatores extracelulares produzidos pela bactéria, como a fosfolipase, hemolisina e uma toxina letal a ratos, estejam associados à produção de toxinfecção. Sua presença pode indicar contaminação de matérias-primas, bem como condições inadequadas de conservação, relacionadas à temperatura (Notermans & Batt, 1998).

Os meios contendo gema de ovo e polimixina são indicados para seu isolamento, uma vez que poucos microrganismos produzem reações parecidas às produzidas pelo *B. cereus*. Ele é tido como resistente a certas concentrações de Polimixina B, que são eficientes para inibição da microbiota acompanhante. Suas cepas produzem lecitinase degradando produtos insolúveis da lecitina presentes na gema de ovo que se acumulam em volta das colônias formando um precipitado branco característico. Em muitas colônias esta reação se apresenta

precocemente, de forma que, com frequência, é possível fazer uma identificação rápida, inclusive antes que eventuais cepas polimixina-resistentes acompanhantes alcancem pleno desenvolvimento. Os meios mais usados são o ágar manitol vermelho de fenol - gema de ovo com polimixina B (MYP), segundo Mossel & Garcia (1983), ou o ágar polimixina-piruvato gema de ovo-manitol azul de bromotimol (PEMPA), segundo Holbrook & Anderson (1980) e ICMSF (1998).

Os métodos convencionais para a identificação de *B. cereus* consistem de testes bioquímicos e análises microscópicas da morfologia da célula necessária principalmente para a diferenciação do *B. thuringiensis* que tem características bioquímicas similares.

Provas bioquímicas, como testes VP, redução de nitrato, prova de liquefação de gelatina, prova do leite tornassol, fermentação da lactose, entre outras, são utilizadas na sua identificação presuntiva, seguida de confirmação pela presença de toxinas (ICMSF, 1983; Mossel & Garcia, 1983; ICMSF, 1998; Silva et al., 1997).

O *Bacillus cereus* é um patógeno toxígeno reconhecido que causa dois tipos distintos de toxinfecção, diarréica e emética (CDC, 1978; WHO, 1987; Buchanan & Schultz, 1992; ICMSF, 1998; Notermans & Batt, 1998). A forma clássica tem um período de incubação médio de 10 a 13 horas e se manifesta por sintomas, como colites agudas ou enterocolites. Caracteriza-se por dor abdominal, diarréia profusa e tenesmo retal. As náuseas são moderadas e os vômitos raros. Esta forma de toxinfecção tem grande semelhança, em seus sintomas e período de incubação, com a produzida por *Clostridium perfringens*.

A natureza desta toxina, que é responsável pela resposta diarréica, não é bem estabelecida, mas suas propriedades estão sendo debatidas há muitos anos. Em 1984, Thompson et al. isolaram três componentes tóxicos (B, L₁, L₂) com atividade hemolítica. O componente B, aparentemente, é um mediador de

aglutinação de eritrócitos e tem sido clonado e sequenciado. Os dois componentes L (L_1 e L_2) os quais são mediadores de lise, também têm sido clonados e sequenciados. A enterotoxina clássica de *B. cereus* tem sido examinada por meio de ensaios em alça ileal de coelhos. Uma segunda enterotoxina diarreica tem sido descrita, e difere dos três componentes da via de hemolisina. A proteína purificada exibe Vero toxicidade celular, mostrando permeabilidade vascular e promovendo acúmulo de líquido na alça ílica nos testes com coelho (Notermans & Batt, 1998).

Somente poucos estudos têm apresentado o modo de ação da enterotoxina. Há indicações de que a união nos receptores das células epiteliais intestinais é fraca para bloquear os efeitos com antisseros hábeis. A enterotoxina rompe a membrana das células epiteliais, mas o mecanismo não é claro, sabendo-se apenas que esta enterotoxina é, no mínimo cem vezes mais potente que a enterotoxina do *Clostridium perfringens* (Kramer e Gilbert, 1989; Lund & Granum, 1996; Notermans & Batt, 1998).

A segunda forma de toxinfecção tem um período de incubação mais curto, na maioria dos casos 1 a 5 horas e um quadro clínico com gastrites agudas ou gastroenterites. As náuseas e vômitos agudos são os sintomas predominantes, parecendo-se assim com a toxinfecção estafilocócica (ICMSF, 1998). Os estudos da toxina emética têm sido complicados por não ter um modelo de sistema sustentável para análise de sua atividade.

Nos surtos de forma clássica, são necessários números elevados de células viáveis para que se origine a enfermidade. O aparecimento relativamente rápido dos sintomas, a curta duração do processo e a ausência de febre sugerem que a segunda forma de enfermidade produzida pelo *B. cereus* é uma verdadeira intoxicação. Por isso, é necessária a produção de uma enterotoxina durante o crescimento da bactéria no alimento (ICMSF, 1998; Notermans & Batt, 1998). O *Bacillus cereus* produz toxinfecções alimentares somente quando o alimento

ingerido contém números elevados de células, geralmente superiores a $10^7/g$ ou ml (Frazier, 1985; Mossel & Garcia, 1983; APHA, 1992; Jay, 1994; ICMSF, 1998). Portanto a contagem de *B. cereus* é fator decisivo na hora de avaliar o significado deste microrganismo nos alimentos. De acordo com o ICMSF (1998) os alimentos que contém água em abundância ou foram reconstituídos contendo cifras de *B. cereus* $>10^6/g$ ou ml, são considerados potencialmente perigosos. Segundo Gilbert et al. (1974), raramente são produzidos casos de toxinfecções por alimentos com índices de 10^4 ou 10^5 células de *B. cereus* por g ou ml.

Os principais fatores que contribuem para a ocorrência de enfermidade alimentar estão relacionados à utilização de alimentos crus ou ingredientes contaminados por esporos, cozimento e resfriamento inadequados, equipamento contaminado, intervalo de tempo entre preparo e consumo igual ou superior à 12 horas, manutenção do alimento quente a temperaturas impróprias e reaquecimento inadequado (Gilbert et al., 1974; Harmon & Kautter, 1991; Beecker et al., 1994; ICMSF, 1998).

Não são muitos os dados disponíveis na literatura relacionados com os aspectos epidemiológicos envolvendo *B. cereus*. Trabalhos desenvolvidos na Hungria, no período de 1960 a 1968, revelaram que do total de surtos envolvendo *B. cereus*, 53,8% tiveram como veículo produtos cárneos, 10,6% vegetais, 9,6% leite e cacau em pó e 17,7% outros tipos de alimentos (CDC, 1978).

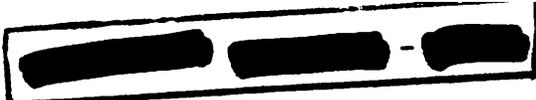
No Brasil não existem dados epidemiológicos sobre a ocorrência de enfermidades ocasionadas pelo *B. cereus* decorrentes do consumo de vegetais e as informações sobre surtos envolvendo outros alimentos são também escassas. Segundo Eiroa (1989), isto decorre do fato dessas doenças não serem obrigatoriamente notificadas. Além disso, falta pessoal qualificado nos locais onde os surtos acontecem e é freqüente os responsáveis pelos locais onde tais incidentes ocorrem de tratarem de minimizar a importância do fato, procurando

sufocá-lo imediatamente para evitar manifestações incômodas.

Dos dezenove surtos de enfermidade alimentar confirmados laboratorialmente em Campinas, entre 1987 e 1993, *B. cereus* foi o agente etiológico responsável por 68,4% (Passos & Kuaye, 1996). Esta bactéria foi incriminada e 78,6% destes surtos estavam relacionados com condições inadequadas em serviços de alimentação para coletividades. Dentre os casos relatados pelos autores, verifica-se que 23,08%, foram ocasionados pelo consumo de arroz cozido, 7,69% tinham hortaliças como ingredientes, 46,15% envolviam farinhas e 23,08% carne. Produtos da merenda escolar, alimentos desidratados, frutas e hortaliças, carnes e produtos cárneos, leite e derivados, cereais, condimentos, molhos preparados, produtos de confeitaria e panificação, e macarrão industrializado são também citados em outras pesquisas como responsáveis por surtos originados por *B. cereus* no país (Delazari et al., 1978).

Informações de surtos de toxinfecções em outros países também têm sido restritas para casos que envolvem duas ou mais pessoas. Zottola e Smith (1990) informam que dados obtidos do CDC 1990, referentes aos surtos de toxinfecção alimentar ocorridos no período de seis anos, 37% foram devido a *Salmonella*, 23% a *S. aureus*, 14% a *Clostridium perfringens*, 11% a *Clostridium botulinum*, sendo apenas 3,83% dos surtos relacionados ao *Bacillus cereus*.

A habilidade do *B. cereus*, para sobreviver sob condições adversas do meio, adaptação e eventualmente multiplicação nos alimentos, faz dele a bactéria de maior destaque na deterioração de alimentos (Mahakarnchanakul e Beuchat, 1999). Segundo os autores, as mudanças na resistência ao calor ou às temperaturas de refrigeração, assim como tolerância ao NaCl, podem influenciar na sua habilidade para crescer em alimentos MP durante a distribuição e estocagem. A disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, atividade de água e a presença de aditivos são os fatores que mais afetam a taxa de crescimento e a produção de toxina pelo *B. cereus* psicrotrófico (Benedict et al., 1993).



O efeito de diferentes temperaturas sobre o crescimento de cepas de *B. cereus*, foi avaliado por Fermanian et al. (1994). O crescimento máximo permitido ocorreu na faixa de temperatura de 46 a 50°C, não ocorrendo crescimento acima de 50°C. Rápido crescimento foi observado a 42°C e este pôde ser retardado a 20°C, quando a lag fase pôde durar 7horas. Por outro lado, Marth (1998) alerta que patógenos ocasionais, como *B. cereus*, podem crescer sob temperaturas de refrigeração comprometendo assim a vida útil e a qualidade de produtos refrigerados.

Embora exista clássica referência desta bactéria como mesófilos esporiformes, o interesse nas espécies psicrotróficas tem aumentado recentemente com a determinação de que estes microrganismos ocorrem largamente em produtos submetidos a baixas temperaturas e que uma percentagem significativa é capaz de crescimento sob condições de refrigeração. Além disso, alguns pesquisadores informam que uma percentagem significativa de *B. cereus* psicrotróficos produzem a enterotoxina diarréica (Rodriguez & Barrett, 1986; Buchanan & Schultz, 1992; Fermanian et al. 1994; Mahakarnchanakul & Beuchat, 1999; Helgason et al., 2000).

Vários estudos reportados por Buchanan & Schultz (1992) indicam a produção de enterotoxina pelo *B. cereus* a temperaturas tão baixas quanto 4°C ou mesmo em sorvetes. Assim, a proliferação e produção de toxinas por esta bactéria em produtos refrigerados são totalmente viáveis, tornando os produtos MP possíveis fatores de toxinfecção por este agente.

Maxcy (1982) analisou o crescimento da microbiota contaminante em folhas de alface cortadas ou rasgadas e suco de alface. O autor observou que *B. cereus* cresceu essencialmente no suco de alface e em alface MP embalado a vácuo, somente decrescendo significativamente na taxa da microbiota normal presente nos produtos. Todos os resultados indicaram que a liberação do exsudato das folhas de alface pode ser um importante refúgio para bactérias de

significado em saúde pública.

Nguyen-the & Carlin (1994) apresentaram dados referentes à presença de *B. cereus* em broto de feijão nos Estados Unidos. Encontrado normalmente no ambiente de cultivo de frutos e hortaliças, sua presença provavelmente não é resultado de uma contaminação externa ou durante o processamento. Beuchat (1996) reporta que Robert et al. isolaram esporos de *B. cereus* de cerca de um terço das cem amostras de vegetais analisadas, principalmente de saladas obtidas no comércio varejista. Esclarecem os autores que, somente quando os produtos são manuseados de maneira que permita a germinação de esporos e crescimento das células vegetativas há uma ameaça para o consumidor.

Surtos de gastroenterite causadas pelo consumo de sementes, brotos e de hortaliças cruas contaminados com *B. cereus*, ocorridos nos Estados Unidos, em 1973, foram também descritos por Beuchat (1996). As infecções ocorreram após o consumo de soja, mostarda e agrião, sendo que os esporos cresceram por três dias em kits de sementeiras, possibilitando assim a esporulação e conseqüentemente, a produção de toxinas.

2.5.5 *Listeria monocytogenes*

Os membros do gênero *Listeria* são definidos como bastonetes curtos (cocoides) regulares, Gram positivos, não esporogênicos, catalase positivos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glucose com produção de ácido láctico sem produção de gás e não produtores de H₂S (Messina et al., 1988; Silva et al., 1997; ICMSF, 1998; Almeida et al., 1999).

Encontram-se amplamente distribuídos no ambiente, tendo sido isolados de insetos, forragens, solo, vegetais em decomposição, material fecal, efluentes de abatedouros, esgotos, água de rio, aves e mamíferos silvestres, animais domésticos, pescado e roedores. O meio primário de transmissão ao homem é pela contaminação dos alimentos em qualquer ponto da cadeia alimentar

(Messina et al., 1988; Eiroa, 1990; Baek et al., 2000; Bell & Kyriakides, 2000b).

Crescem em ampla faixa de temperatura (3° a 45°C), com ótimo entre 30° a 37°C. Em função da capacidade de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, são considerados criotolerantes e psicotolerantes e são também osmotolerantes (Baek et al., 2000). São móveis entre 20° e 25°C, mostrando movimentos rotatórios característicos ou de tombamento, porém não apresentam motilidade entre 35° e 37°C. Exibem elevada tolerância ao sal e calor, sendo capazes de crescer em temperaturas <4°C, demonstrando também facilidade de crescimento em substratos com baixo pH e atividade de água (Pereira & Rocourt, 1993).

De acordo com Eiroa (1990) até 1979 não havia sido relatado nenhum surto de listeriose humana veiculada por alimentos. A descrição desta bactéria se reporta há mais de 60 anos, quando foi isolada em coelhos e cobaias e descrita como responsável por enfermidades nestes animais. Foi primeiramente denominada de *Bacterium monocytogenes* porque infectavam os monócitos do sangue (ICMSF, 1998; Bell & Kyriakides, 2000b).

Bell & Kyriakides (2000a) informam que os índices de listeriose na população humana sempre foram encobertos por outras enfermidades transmitidas pelos alimentos, como salmonelose e campilobacteriose, sendo a confirmação de surtos de listeriose humanas pouco freqüente.

Pereira & Rocourt (1993) informam que estudos mostraram ser esta bactéria filogeneticamente constituída por dois grupos genomicamente distintos. Constitui-se de sete espécies, acrescentando a *L. grayi* como participante do gênero. Os autores esclarecem que, com exceção de *L. grayi* e *L. murrayi*, todas são contaminantes de alimentos, sendo que Jay (1994) destaca as espécies mais freqüentes em alimentos como sendo de *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Bergey's, 1994) lista oito espécies no gênero *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L.*

welshimeri, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi* e *L. denitrificans*. Destas, as espécies *L. grayi* e *L. murrayi* são consideradas como subespécies de uma simples espécie redefinida, a *L. grayi*; a *L. denitrificans* aparece no novo gênero *Jonesia*. Assim, seis espécies podem ser diferenciadas: 1) *L. ivanovii* e *L. monocytogenes*, que são patogênicas para cobaias, mas somente a *L. monocytogenes* é consistentemente associada com enfermidades humanas; 2) *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi* não aparecem como patógenos humanos.

Segundo Silva et al. (1997), o gênero *Listeria* encontra-se constituído por cinco espécies: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivannovii*, *L. innocua* e *L. welshimeri*. Seis espécies são destacadas pelo ICMSF (1998), sendo a *L. innocua* e *L. murrayi* consideradas patogênicas, enquanto que *L. seeligeri*, *L. ivannovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecção humana. A *L. monocytogenes* é considerada a espécie patogênica mais importante.

No final do século XIX, a *Listeria monocytogenes* foi descrita como responsável por infecções humanas e animais. A ração contaminada consumida pelos animais, especialmente a forragem elaborada incorretamente, foi indicada como causa da listeriose. Porém, a existência de uma causa similar da infecção humana não foi admitida universalmente até princípios da década dos anos oitenta, apesar de um importante surto ocorrido na Alemanha, em 1949 a 51, relacionado ao consumo de leite cru (ICMSF-1998). Eiroa (1990) relata que quando, na cidade de Boston, Estados Unidos, vinte pessoas contraíram listeriose, ela foi atribuída ao consumo de saladas de alface, tomate e salsão. Informa ainda que, em 1981, foram constatados 41 casos de listeriose no Canadá, devido ao consumo de salada de repolho. Neste caso, as investigações apuraram que a contaminação do repolho ocorreu devido ao uso de adubo orgânico contendo esterco de ovelhas criadas no local, que estavam infectadas pela bactéria.

Segundo Brackett (1992), as condições ambientais de armazenamento

vão influenciar na população microbiana e no tempo de duração do produto fresco estar seguro ao consumo. Esclarece, ainda, que o longo tempo de estocagem sob temperaturas de refrigeração será seletivo para organismos psicrotróficos. Considerando que algumas bactérias patogênicas crescem bem sob condições de refrigeração e que *Listeria monocytogenes*, por ser psicrotolerante, continua crescendo a estas temperaturas, as condições ambientais e de embalagem de produtos minimamente processados geralmente não seriam barreiras suficientes para impedir o crescimento destas. São, portanto, causa de preocupação e risco à saúde do consumidor.

Listeria monocytogenes é geralmente reconhecida como o principal patógeno para o homem dentro do gênero *Listeria*. Embora os mecanismos de patogenicidade não sejam compreendidos com clareza, a infecção depende de uma variedade de fatores que incluem o estado imunológico do hospedeiro, a quantidade de inócuo e a virulência específica da cepa de *L. monocytogenes* (Bell & Kyriakides, 2000a). Almeida et al. (1999) explicam que após a ingestão do alimento contaminado, a *L. monocytogenes* é capaz de cruzar a barreira intestinal, multiplicar-se e se difundir para outros órgãos como fígado e baço, onde causa formação de granulomas. Quando ocorrem infecções mais severas esta bactéria pode romper as barreiras do endotélio e difundir-se para o cérebro ou placenta.

Hofer & Pova (1984) reportam que estudos desenvolvidos no Brasil durante o período de 1965 a 1983, a partir de 71 amostras de *L. monocytogenes* isoladas de processos patológicos e de portadores humanos, mostraram a predominância do sorovar 4b (50,78%) e do sorovar 1/2a (29,6%).

Em estudos realizados por Hofer et al. (2000), no período de 1971 a 1997, utilizou a técnica de fenotipagem para caracterização de espécies e sorovar de 3112 cepas de *Listeria* de diferentes amostras, incluindo alimentos e constituintes ambientais. Os resultados mostraram que 72,9% das cepas

recuperadas foram de *L. innocua* e 24,8% de *L. monocytogenes*, destacando os sorovars 4b, 1/2a e 1/2b como os mais prevalentes de *L. monocytogenes*.

A incidência de *L. monocytogenes* em vários tipos de alimentos encontrada por Baek et al. (2000), no período de 1993 a 1997, assim como a caracterização por sorotipagem das cepas isoladas, demonstrou que 7,9% das amostras continham *L. monocytogenes* e que as cepas isoladas foram predominantemente identificadas como sorovar 1/2b e 1/2a.

Os sorovars 6a e 6b são descritos como linhagens não patogênicas de diferentes espécies de *Listeria* (Pereira & Rocourt, 1993; Bell & Kyriakides, 2000b; Hofer, 2000).

Almeida et al. (1999) explicam que embora haja uma margem de risco para todos os consumidores, este patógeno é particularmente temido devido à forte associação com septicemia, encefalite, meningite, aborto espontâneo e morte em neonatos, idosos e pacientes imunodeprimidos. Em revisão realizada por Rocourt (1996) sobre os principais grupos de indivíduos com risco de sofrerem listeriose, destacaram-se, por ordem decrescente, pessoas submetidas à transplante de órgãos, pacientes com AIDS, indivíduos infectados pelo vírus HIV, gestantes, enfermos com câncer e anciões.

Bell & Kyriakides (2000a) esclarecem que a *L. monocytogenes* pode causar vários tipos de infecções. Porém, a mais freqüente é a listeriose que toma forma de uma infecção no útero, no sangue ou no sistema nervoso central. Adultos sadios podem também desenvolver a listeriose normalmente como meningites e septicemia. Os autores alertam para a possibilidade de um aumento na proporção de indivíduos vulneráveis dentro da população mundial, devido ao aumento no número de grupos imunodeprimidos e de anciões durante os últimos anos.

Estas informações são respaldadas por Messina et al. (1988) e Baek et al. (2000). Segundo esses autores, a *L. monocytogenes* causa infecção severa e

até fatal em grande número de pessoas susceptíveis, em grande número de recém-nascidos, idosos, gestantes e pessoas imunocomprometidas, alcançando alta taxa de mortalidade, chegando até 30% dos casos registrados.

Brackett (1987b) destaca que o estreito relacionamento da *L. monocytogenes* com as plantas e o solo sugere uma grande chance dos vegetais serem contaminados com este microrganismo. Um dos maiores surtos de listeriose humana traçada, relacionados com a ingestão de alimentos ocorridos no mundo, foi associado ao consumo de salada de repolho cru (Brackett, 1987b; Messina et al. 1988; Baek et al., 2000). Em outra instância, alface, tomate e aipo também foram implicados em casos de listeriose (Hofer, 1975; Brackett, 1987b). Estudos citados por Eiroa (1990) evidenciam surtos de listeriose devido ao consumo de vegetais contaminados, principalmente por alface, tomate, salsa e repolho. Baek et al. (2000) também destacam os vegetais crus, leite e queijo tipo mexicano como suspeitos de veicularem os maiores surtos e casos esporádicos de listeriose nas duas últimas décadas.

Ernderling et al. (2000) citam uma variedade de alimentos tais como vegetais, leite, produtos cárneos, frango e vários queijos como veículos de *L. monocytogenes*. Este fato tem particular interesse para a indústria de alimentos e órgãos de saúde pública, uma vez que esta bactéria é uma ubíqua natural e pode crescer a temperaturas de refrigeração. Os autores ainda informam que, embora os alimentos marinhos tenham recebido menor atenção que outros alimentos, um surto na Nova Zelândia, em 1980, foi relacionado ao consumo de pescado ou produtos de pesca.

A ocorrência de *L. monocytogenes* em alface, repolho, salsa e agrião foi determinada em várias épocas do ano por Porto & Eiroa (2001). A incidência da bactéria foi determinada a partir do enriquecimento em caldo e incubado a 4°C por 30 dias, com posterior isolamento em ágar Palcam e Oxford. A incidência total de *L. monocytogenes* nas hortaliças examinadas foi de 3,2%. A população

detectada em alface foi de 1,2 NMP/g, não sendo detectada a bactéria em nenhuma das amostras de repolho analisadas. Para estabelecer uma relação com a sazonalidade dos produtos, os autores informam que o isolamento do organismo ocorreu em 62,5% no mês de janeiro, 12,5% em junho e 25% no mês de julho. É possível também relacionar com a temperatura ambiente, considerando serem estes meses de chuva ou frio, o que determina temperaturas ambientes mais baixas e adequadas à proliferação da bactéria.

Parece que o processamento dos alimentos exerce efeito seletivo para o crescimento de determinados sorotipos de *Listeria monocytogenes* presentes originalmente na matéria-prima ou pela contaminação dos mesmos por cepas adaptadas ao ambiente de processamento (Almeida et al., 1999). Esta bactéria apresenta resistência a vários fatores ambientais, tais como temperatura, pH, atividade de água, muitos agentes antimicrobianos e preservativos como ácidos, álcalis e sal, tornando sua eliminação muito difícil (Brackett, 1987b; Ryser & Marth, 1988; El-Kest & Marth, 1988; Messina et al., 1988; Carlin et al., 1995; Barbosa et al., 1995; Zhang & Faber, 1996; Buchanan & Golden, 1998; Almeida et al., 1999; Baek et al., 2000).

3 Referências Bibliográficas

ABE, K.A. ; WATADA, A.E. Ethylene absorbent to maintain quality of lightly processed fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, Chicago, v.56, n.6, p.1589-1592, Nov./Dec. 1991.

AHVEMAINEN, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends Food Science Technology**. v.7, n.1, p.179-187, Jan. 1996.

ALMEIDA, P. F. de; ALMEIDA, R. C. de C.; RODRICK, G. G. *Listeria monocytogenes*: importância e discriminação nos alimentos. **Higiene Alimentar**, v.13, n.61, p.19-23, set. 1999.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington, 1992. 1219 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington, 1995.

AWAD, M. **Fisiologia pós-colheita de frutos**. São Paulo: Nobel, 1993. 113 p.

AYHAN, Z. ; CHISM, G. W. ; RICHTER, E.R. The shelf-life of minimal processed fresh cut melons. **Journal of Food Quality**, v. 21, p. 29-40, 1998.

BABIC, I. ; WATADA, A. E. Microbial populations of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmospheres. **Postharvest Biology Technology**, v. 9, p. 187-193, 1996.

BAEK, S.Y. et al. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. **Journal of Food Protection**, v.63, n.2, p.186-189, 2000.

BAIRD, R. M.; LEE, W. H. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.26, n.1, p.15-24, June 1995.

BALDWIN, E. A. ; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. ; BAKER, R. A. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, v. 30, n.1, p. 35-40, 1995.

BARBOSA, W. B. et al. Growth potential of individual strains of *Listeria monocytogenes* in fresh vacuum-packaged refrigerated ground top rounds of beef. **Journal of Food Protection**, v. 58, n.6, p.1586-1588, Nov./Dec. 1995.

BARRIGA, M. I. et al. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1586-1588, Nov./Dec. 1991.

BAUMAN, H. E. The HACCP concept and microbiological hazard categories. **Food Technology**, v. 28, n. 9, p.30-34, 1974.

BEECKER, H.; SCHLLER, G.; VON WIESE, W. ; TERPLAN, G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, n.1, p.1-15, 1994.

BELL, C. ; KYRIAKIDES, A. *Escherichia coli*: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Zaragoza-Espanha: Acribia, 2000a. 234p

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *Listeria*: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Zaragoza-Espanha: Acribia, 2000b. 173p.

BENEDICT, R. C. et al. *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. **Journal of Food Protection**, v.56, n. , p.211-214, 1993.

BENNIK, M. H. J. et al. Microbiology of minimally processed modified-atmosphere packaged chicory endive. **Postharvest Biology and Technology**, v.9, p. 209-221, 1996.

BENNIK, M. H. J. et al. The influence of oxygen carbon dioxide on the growth of prevalent *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* species isolated from fresh and controlled-atmosphere-stored vegetables. **Food Microbiology**, v.15, p.459-469, 1998.

BERDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, n.2, p.91-100, Mar.1990.

BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, n.2, p.91-100, Mar.1990.

BERGEY'S MANUAL® OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. **Bacteriological analytical manual**. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 1687p.

BERRANG, M. E. ; BRACKETT, R. E. ; BEUCHAT, L. R. Microbial, color and textural qualities of fresh asparagus, broccoli, and cauliflower stored under controlled atmosphere. **Journal Food Protection**, v.53, p391-395, 1990.

BERRANG, M. E.; BRACKETT, R. E.; BEUCHAT, L. R. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. **Journal of Food Protection**, v.52, n.10, p.702-705, Oct. 1989.

BERRY, E. D. ; CUTTER, C. N. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, p.1493-1498, Apr. 2000.

BETTELHEIM, K.A. Identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by means of their production of enterohaemolysin. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, n. 1, p.178-180, 1995.

BETTELHEIM, K.A. Reliability of CHROMagar®O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, n. 4, p.425-428, 1998.

BEUCHAT, L. R. ; DOYLE, M. P. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in foods treated on supplemented with carrot juice. **Food Microbiology**, v.12, p.73-80, 1995.

BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by. **Journal of Food Science**, v.55, n.3, p.755-758, May/June 1990.

BEUCHATT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, v.59, n.2, p.204-216, Feb. 1996.

BOLIN, H.R. ; HUXSOLL, C. C. Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad-cut lettuce. **Journal Food Processing Preservation**, v.13, p.281-292, 1991.

BOLIN, H.R. ; HUXSOLL, C. C. Storage stability of minimally processed fruit. **Journal Food Processing Preservation**, v.13, p. 281-289, 1989.

BOLIN, H.R. et al. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, p. 1319-1321, 1977.

BRACKETT, R. E. Alteración microbiológica y microorganismos patógenos de frutas y hortalizas refrigeradas minimamente processadas. In: WILEY, R. C. **Frutas y hortalizas minimamente processadas y refrigeradas**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1997. p.263-304.

BRACKETT, R. E. Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. (Ed.). **Minimally processed refrigerated fruits & vegetables**. New York : Chapman & Hall, 1994. p.269-312

BRACKETT, R. E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 50, n.12, p.999-1003, dez. 1987b.

BRACKETT, R. E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of food Protection**, v. 55, n. 10, p. 808-814, 1992.

BRACKETT, R.E. Effect of modified atmosphere packaging on the microflora of fresh tomatoes. **Journal Food Quality**, v. 11, n. 1, p. 89-105, Jan. 1988.

BRACKETT, R.E. Microbiological consequences of minimally processed fruits. **Journal Food Quality**, v.10, n. 2, p. 195-206, 1987a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.º 12, de 02 de janeiro de 2001**. Disponível em: <file://Anvisa-Legislação-Resolução.htm>. Acesso em: 26 jan. 2001

BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância Sanitária. **Portaria n.º 451, de 19 de setembro de 1997**. Brasília, 1997.

BRECHT , P. E. Use of controlled atmospheres to retard deterioration of produce. **Food Technology**, v. 34, n. 3, p. 45-50, Mar. 1980.

BRECHT, J.K. Physiology of lightly processed fruit and vegetables. **HortScience**, v.30, n.1, p.18-22, Feb. 1995.

BUCHANAN, R. L. ; DOYLE, M. P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E.coli*. **Food Technology**, v.51, n.10, p.69-76, Oct. 1997.

BUCHANAN, R. L.; GOLDE, M. H. Interactions between ph and malic acid concentration on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Safety**, v. 18, n. 1, p. 37-48, 1998.

BUCHANAN, R. L.; SCHULTZ, F. J. Evaluation of the Oxoid BCET-RPLA Kit for the detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxins as compared to cell as compared to cell cultures cytotoxicity. **Journal of Food Protection**, v.55, n.6, p.440-443, June 1992.

CAMEROM, A. C.; TALASILA, C.; JOLES, D. W. Predicting film permeability needs for modified atmosphere packaging of lightly processed fruits and vegetables. **HortScience**, v. 30, n. 1, p. 25-34, 1995.

CAMPOS, C. L. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Ateneu, 1999. Cap. 29, p. 229-234.

CANTWELL, M. Postharvest handling: minimally processed fruits and vegetables. In: _____. **Postharvest technology of horticultural crops**. 2.ed. California: University of California. Division of Agriculture and Natural Resources, 1992. p. 277-281.

CARLIN, F. ; NGUYEN, C.; SILVA, A. A. da. Factores affecting the growth of *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh endive. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, n. , p.636-646, 1995.

CARVALHO, C. O. ; SERAFINI, A. B. Grupos de microrganismos isolados da orofaringe, nasofaringe e das mãos dos trabalhadores do Restaurante da Universidade Federal de Goiás. **Higiene Alimentar**, v.10, n.45, p.19-45, set./out. 1996.

CASTRO, M.M. de M. V.; IARIA, S. T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no vestíbulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de Hospitais do município de João Pessoa-PB. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.18, , p.235-245, 1984.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION Outbreaks of foodborne disease in the United States. **Journal Infections Diseases**, p.213-217, 1978.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonellosis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/incided/diseases/foodborn/salmon.htm/1999/03>>. Acesso em: 03 mar. 1999.

CHANG, T. C. ; HUANG, S. H. Evaluation of coagulase activity and protein A production for the identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, v.58, n.8, p.858-862, Aug. 1995.

CHANG, T. C. Prevalence of *Salmonella* spp in poultry broilers and shell eggs in Kores. **Journal of Food Protection**, v. 63, n.5, p.655-658, 2000.

CHAPMAN, P. A. Verocytotoxin - producing *Escherichia coli* O157 infections. **British Food Journal**, v.97, n.10, p.29-31-199, Oct. 1995.

CHARNI, N. et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against vegetative cells of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p2278-2281, May 2000.

CHEN, J. ; JOHNSON, R. ; GRIFFITHS, M. Detection of verotoxigenic *Escherichia coli* by magnetic capture hybridization PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.1, p.147-152, Jan. 1998.

CHITARRA, M. I. F. **Processamento mínimo de frutos e hortaliças**. Viçosa – MG: Centro de Produções Técnicas, 1998. 87p.

CORLETT JR., D. A. Refrigerated foods and use of hazard analyses and critical control point principles. **Food Technology**, v.43, n.2, p.91-94, Feb. 1989.

CURRIER, M. et al. *Salmonella* in swine at slaughter: incidence and serovar distribution at different seasons. **Journal of Food Protection**, v.49, n.5, p.366-368, May 1986.

D'AOUST, J. Y. et al. Performance assessment of the GENE-TRAK® colorimetric probe assay for the detection of foodborne *Salmonella spp.* **Journal of Food Protection**, v.58, n.10, p.1069-1076, Oct. 1995.

DEAK, T. Microbial-ecological principles in controlled atmosphere storage of fruit and vegetables. In: _____. **Microbial Association and Interactions in Foods**. Budapest: Akademiai Kiado, 1984. p.9-22.

DEL ROSARIO, B. A.; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. **Journal of Food Protection**, v.58, n.1, p.105-107, Jan.1995.

DELAZARI, I. et al. *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, n.60, p.31-40, nov./dez. 1978.

DIAZ, C. ; HOTCHKISS, J. H. Comparative growth of *Escherichia coli* O157:H7, spoilage organisms and shelf-life of shredded iceberg lettuce stored under modified atmospheres. **Journal Science Food Agriculture**, v. 70, p.433-438, 1996.

DORN, C. R. *Escherichia coli* O157:H7. *Javma*, v.206, n.10, p1583-1585, May 1995.

EIROA, M. N. U. Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causado por alimentos processados. *Coletânea ITAL*, Campinas, v.19, n.2, p.101-102, jul./dez.1989.

EIROA, M. N. U. *Listeria monocytogenes* - Características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. *Coletânea ITAL*, Campinas, v.20, n.1, p.13-22, 1990.

EL-KEST, S. E. ; MARTH, E. H. Temperature, pH, and strain of pathogen as factors affecting inactivation of *Listeria monocytogenes* by chlorine. *Journal of Food Protection*, v. 51, n. 8, p. 622-625, Aug. 1998.

ERDELING, S.; AINSWORTH, A. J.; AUSTIN, F.W. Pathogenicity and production of virulence factors by *Listeria monocytogenes* isolates from channel catfish. *Journal of Food Protection*, v.63; n.5, p.613-619, 2000.

FERMANIAN, C.; FREMY, J. M. ; CLAISSE, M. Effect of temperature on the vegetative growth of type and field strains of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, v.19, n.6, p.414-418, Dec. 1994.

FLOROS, J. D. The shelflife of fruits and vegetables. In *Shelf lives studies of foods and beverages: chemical, biological and nutritional aspects*. [s.l]: Elsevier Science, 1993. p. 195-247.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual online: *Listeria monocytogenes***. 2001. Cap. 10, p.1-11. Disponível em :<file://C:\Microbiological\Mastite\FDA-CFSAN>. Acesso em: 18 jan. 2001.

FOSTER, E. M. The problem of *Salmonella* in food. *Food Technology*, v.23, n. 9, p.74-78, Sept. 1969.

FOSTER, T. **Staphylococcus**. Medmicro. Cap. 12, p. 1-15, Sept. 2000.
Disponível em: <
<http://www.Me://C:Meusdocumentos\MinnasWebs\Assuntosdaescol...\MedimicroChapter12Staph.nt>>. Acesso em: 09 set. 2000.

FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1985. 522p.

FREIRE Jr., M. **Efeito da temperatura de armazenamento e da atmosfera modificada na qualidade da alface hidropônico minimamente processado**. 1999. 132 p.Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GAGLIARDI, J. V. ; KARNS, J. s. **Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices**. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.877-883, 2000.

GAY, J. M. ; FOX, L. K. ***Staphylococcus aureus* detection: does the staph-AB test fit?** Disponível em: <
www.uwrf.edu/biotech/workshop/activity/act/16/annexd3.htm>. Acesso em: 03 set. 2000.

GILBERT, R. J. ; STRINGER, M. F. ; PEACE, T. C. **The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of poisoning**. **Journal Hygiene, Great Britain**, v. 73, n.5, p. 433-444, May 1974.

GOLDEN, D. A.; RHODEHAMEL, E. J.; KAUTTER, D. A. **Growth of *Salmonella spp.* In cantaloupe, watermelon, and honeydew melons**. **Journal of Food Protection**, v.56, n.3, p. 194-196, 1993.

GOMES, H. de A. ; GALLO, C. R. **Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal comercializados em Piracicaba - SP**. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 15, n. 2, p. 158-161, jul./dez. 1995.

- GORNY, J.R.; HESS-PIERCE, B. , KADER, A.A. Effects of ripeness and stored temperatures on the deterioration rate of fresh-cut peach and nectarine slices. **HortScience**, v.33, n.1, p. 110-113, Feb. 1998.
- GROSS, R. J. et al. Enterotoxigenic and enteroinvasive. *Escherichia coli* strain belonging to a new Ogroup, O167. **Journal Chemical Microbiology**, v.17, n.5, p.521-523, 1983.
- HANCOCK, D. D. et al. Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in Cattle. **Journal of Food Protection**, v. 60, n.4, p.363-366, abr. 1997.
- HARMON, S. M. ; KAUTTER, D. Incidence and growth of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. **Journal of Food Protection**, v. 54, n. , p.372-374, 1991.
- HEIZMANN, W. et al. Rapid identification of *Escherichia coli* by fluorocult media and positive indole reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.12, p.2682-2684, Dec. 1988.
- HEIZMANN, W. et al. Rapid identification of *Escherichia coli* by fluorocult media and positive indole reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.66, n.6, p.2627-2630, June 2000.
- HELGASON, E. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, e *Bacillus thuringiensis* -one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p.2627-2630, June 2000.
- HOBBS, B. C. ; GILBERT, R. J. Microbiological counts in to food poisoning. **INTERNATIONAL CONGRESS OF FOOD SCIENCE Technology**, 4. Summary, v.3, p.159, 1974.
- HOBBS, B. C. **Toxinfeções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1999. v. 2, p.145-280.

HOBBS, G. Ecology of food microorganisms. **Microbial Ecology**, v.12, p. 15-30, 1986.

HOFER, E. ; PESSOA, G. A. ; MELLES, C. E. A. *Listeria* spp. on vegetables for human consumption. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1975, Salvador. **Livro de resumos...** Salvador, 1975. v.6, p.175.

HOFER, E. ; POVOA M. M. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em solos. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.79, n.1, p.45-93, 1984

HOFER, E. ; RIBEIRO, R. ; FEITOSA, D. P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971, to 1997. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n.5, p.615-620, set./out. 2000.

HOLBROOK, R. ; ANDERSON, J. M. Na improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 26, n.,??? p. 753-759, 1980.

HOOVER, D. G. Minimally processed fruits and vegetables: reducing microbial load by nonthermal physical treatments. **Food Technology**, v.51, n.6, p.66-71, June 1997.

HOTCHKISS, J. H.; BANCO, M. J. Influence of new packaging technologies on the growth of microorganisms in produce. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 10, p.815-820, 1992.

HURST, W. C.; SCHULER G. A. Fresh produce processing: and industry perspective. **Journal of Food Protection**, v. 55, n. 10, p 824-827, Oct. 1992.

HURST, W. C. Sanitation of lightly processed fruits and vegetables. **Hort Science**, v. 30, n.1, p.22-24, Feb. 1995.

HUXSOLL, C.C.; BOLIN, H.R. Processing and distribution alternatives for minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 43, n.2, p. 124-128, Feb. 1989.

IARIA, S. T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em doces cremosos vendidos em padarias e confeitarias do município de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 321-337, 1981.

IARIA, S. T., FURLANETTO, S. M. P., CAMPOS, M. L. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em Hospitais de São Paulo, 1976. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.14, p.93-100, 1980.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Ecología microbiana de los alimentos. Factores que afetam a la microbiología de los alimentos**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1980. v. I, p. 613-651.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Técnicas de las análises microbiológicas**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1983. 430p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Ecología microbiana de los alimentos**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1985. v.2, 1989 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1998. 606 p.

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1994. 804p.

JOHNSON, J. L. et al. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a foodborne disease outbreak. **Journal of Food Protection**, v.58, n.6, p.597-603, June 1995.

JONG, L. I. T. et al. Distribución de *Clostridium botulinum* toxigenico en suelos de zonas productoras de hortalizas y otros vegetales en Argentina. **Higiene Alimentar**, v.12, n.58, nov./dez. 1998.

KADER, A. A. Postharvest biology and technology: an overview. In: _____. **Postharvest technology of horticultural crops**. 2nded. California: University of California. Division of Agriculture and Natural Resources, 1992. p. 15-20.

KAUFFMAN, F. L. How FDA uses HACCP. **Food Tecnology**, v. 28, n. 9, p.51-84, 1974.

KHURDIYA, D.S. Non-thermal methods for preservation of fruits and vegetables: a critical appraisal. **Journal of Food Science Technology**, v. 32, n.4, p.441-452, Apr. 1995.

KIM, Y-R.;CZAJKA, J.; BATT, C. A. Development of a fluorogenic probe-based PCR assay for detection of *Bacillus cereus* in nonfat dry milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.4, p.1453-1459, Apr. 2000.

KING JR., A. D. et al. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. **Journal Food Science**, v. 56, n. 2, p. 459-461, 1991.

KING JR., A. D.; BOLIN, H. R. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. **Food Thecnology**, Chicago, v.43, p. 132-135-139, 1989

KLEIN, B.P. Nutritional consequences of minimal processing of fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, v. 10, p. 179-193, 1987.

KOTILAINEN et al. Application of gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acids for species identification and typhi of coagulase-negative Staphylococci. **Journal of Chemical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 315-322, Feb. 1991.

KRAFTY, A. A. ; REY, C. R. Psychrotrophia bacteria in foods: an up. date. **Food Technology**, v.33, n.1, p.66-71, Jan. 1979.

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. Bacillus cereus and other Bacillus species. In: Doyle, M. P. **Food bacterial pathogens**. New York: M. Delkker, 1989. p. 21-70.

LOGAN, N. A. **Bacterial systematics**. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. 263p.

LUND, B. M.. The effect of bacteria on post-harvest quality of vegetables. In: GOODENOUGH, P.W. (Ed.). **Quality in stored and processed vegetables and fruit**. New York: Academic, 1981. p. 287-300.

LUND, B.M. Bacterial spoilage of vegetables and certain fruits. **Journal Applied Bacteriology**, v.34, p.9-20, 1971.

LUND, T. E. ; GRANUM, P. E. Characterization of a nonhaemolytic enterotoxin complex from Bacillus cereus isolated after a foodborne outbreak. **Microbiology Letters**, v.141, n.1, p.151-156, 1996.

MADDEN, J. M. Microbial pathogens in fresh produce: the regulatory perspective. **Journal of Food Protection**, v. 55, n.10, p. 821-823, 1992.

MAGNUSON, J. A.; KING Jr., A. D.; TÖRÖK, T. Microflora of partially processed lettuce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3851-3854, Dec. 1990.

MAHAKARCHANAKUL, W. ; BEUCHAT, L. R. Effect of shift in growth temperature on tolerance of psychrotrophic and mesophilic strains of *Bacillus cereus* to heat and sodium chloride. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 1, p. 57-64, 1999.

MANZANO, M. et al. Microbial and sensory quality of vegetables for soup packaged in different atmospheres. **Journal Science Food Agriculture**, v.67, n.4, p.521-529, 1995.

MARCHETTI, R.; CASADEI, M. A. ; GUERZONI, M. E. Microbial population dynamics in ready-to-use vegetable salads. **Italian Journal of Food Science**, v.4, n.2, p.97-108, 1992.

MARTH, E. H. Extended shelf life refrigerated foods: microbiological quality and safety. **Food Thecnology**, v. 52, n. 2, p. 57-62, 1998.

MARTINS, L. T. *Staphylococcus*. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. Cap. 18, p.149-156.

MATTICK, K. L. et al. Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Thyphimurium DT104 at low water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.4, p. 1274-1279, Apr. 2000.

MAXCY, R. B. Fate of microbial contaminants in lettuce juice. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 4, p. 335-339, 1982.

MCINGVALE, S. C. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in buttermilk as affected by contamination point and storage temperature. **Journal of Protection**, v.63, n.4, p.441-444, Apr. 2000.

MESSINA, M. C. et al. The effect of liquid smoke on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 8, p.629-631, Aug. 1988.

MOHD-SOM, F. et al. Microflora changes in modified-atmosphere – packaged broccoli florets stored at refrigerated temperature. **Journal of Food Quality**, v.17, n. p.347-360, 1994.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, B. M. **Microbiologia de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1983. 375p.

MOTA, C. C. S. da et al. Toxinfecção alimentar por *Salmonella enteritidis*: relato de um surto ocorrido em Curitiba-Pr-Brasil/julho de 1981. **Higiene Alimentar**, v. 2, n. 3, p. 123-131, set. 1983.

MÜLLER, G. **Microbiologia de los alimentos vegetais**. Zaragoza–Espanha: Acribia, 291p. 1981.

MYERS, R. A. Packaging considerations for minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 43, n. 2, p. 129-131, 1989.

NASCIMANTO, M. R.; STAMFORD, T. L. M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.14, n.70, p32-35, mar.2000.

NEUMAYR, L.; KRÄMER, J. Production of enterotoxin A and thermonuclease by *Staphylococcus aureus* in legumes. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, n.3/4, p.225-234, May 1990.

NGUYEN-the, C. ; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Food Science and Nutrition**, v.34, n.4, p.371-401, 1994.

NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. In: MITCHELL, T.J.; GODFREE, A.F.; STEWART-TULL, D.E.S. **Toxins**. Oxford: Blackwell Science, 1998.p.515-614. (Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement).

O'CONNOR-SHAW, R.E. et al. Shelf life of minimally processed honeydew, kiwifruit, papaya, pineapple na cantaloupe. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 59, n.6, p. 1202-1215, 1994.

PALUMBO, S.A.et al. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v.58, n.4, p.352-356, Apr. 1995.

PARK, C. E., AKHTAR, Ma. ; RAYMAN, M. K. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay Kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.2, p.677-681, Feb.1994.

PARK, C. E.; AKHTAR, Ma. ; RAYMAN, M. K. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of Staphylococcal enterotoxins in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n.8, p. 2509-2512, Aug. 1992.

PARK, C. E.; AKHTAR, Ma. ; RAYMAN, M. K. Simple solutions to false-positive Staphylococcal enterotoxin assays with seafood tested with an enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59,n.7, p. 2509-2512, July 1993.

PASSOS, M.H.C.R. ; KUAYE, A. Y. Relato de surto de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus*: importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.56, n.1, p.71-76, 1996.

PAULL, R. E. ; CHEN, WENJUN. Minimal processing of papaya (*Carica papaya L.*) and the physiology of halved fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 12, p. 93-99, 1997.

PAULL, R. E.et al. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya L.*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 11, p. 165-179, 1997.

PEREIRA, J. L.; MIYA, N.; MAISTRO, L. C. Importância da enumeração rápida de bactérias patogênicas em vegetais folhosos minimamente processados: uma análise. **Higiene Alimentar**, v. 15, n.89, p.15-21, out. 2001.

PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.7, n.26, p.5-12, jun. 1993.

PEREIRA, M. L. et al. Enterotoxinas estafilocócicas: importância e métodos analíticos de detecção. **Higiene Alimentar**, v.13, n.64, p.24-34, set. 1999.

PEREIRA, M. L. et al. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, v. 44, n.68/69, p.32-41, jan./fev. 2000.

PIAGENTINI, A. M.; GÜEMES, D. R. ; PIROVANI, M. E. Efecto del tratamiento químico y tipo de envase sobre la calidad sensorial de espinaca minimamente processada. **Higiene Alimentar**, v. 14, n.74, p32-36, jul. 2000.

PICCOLO, R. C. et al. Surto de salmonelose ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo, em 1991. **Higiene Alimentar**, v.6, n.23, p.28-30, set. 1992.

PIERGIOVANNI, L.; FAVA, P. ; CERIANI, S. A simplified procedure to determine the respiration rate of minimally processed vegetables in flexible permeable packaging. **Italian Journal of Food Science**, v.11, n.2, p.99-110, 1999.

PIROVANI, M. E. et al. Quality of minimally processed lettuce as influenced by packaging and chemical treatment. **Journal of Food Quality**, v.22, n.6, p.475-484, June 1998.

PORTO, E. ; EIROA, M. N. U. Ocurrence of *Listeria monocytogenes*. **Food Protection: vegetables.** Disponível em: www.foodprotection.org/Publications/Abstracts/April2001.htm. Acesso em: 22 abr. 2001.

PRIEPKE, P. E.; WEL, L. S. ; NELSON, A. I. Refrigerated storage of prepackaged salad vegetables. **Journal of Food Science**, v.41, n.2, p.379-382, Mar./Apr. 1976.

QUEIROZ, D. M. M.et al. Identification of a new enteroinvasive *Escherichia coli* strain. **Res. Microbiol.**, v.141, p13-20, Sept./Oct. 1999.

RASSOLY, L.et al. In vitro assay of *Staphylococcus aureus* enterotoxin activity in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 6, p. 2361-2365, June 1997.

RISER, E. T. ; MARTH, E. H. survival of *listeria monocytogenes* in cold-pack cheese food during refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, v.51, n. 8, p. 615-621, Aug. 1988.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, v.7, n.4/5 p.195-202, 1996.

RODRIGUEZ, M.H. ; BARRETT, E.L. Changes in microbial population and growth of *Bacillus cereus* during storage of reconstituted dry milk. **Journal of Food Protection**, v.49, n.9, p.680-686, Sept. 1986.

RONK, R. J. ; CARSON, K.L. ; THOMPSON, P. Processing, packaging and regulation of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v.43, n.2, p.136-139, Feb. 1989.

SADOVSKI, A. Y.; FARBER, A. *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* in frozen vegetables. Incidence and survival after treatments commonly used at the vegetable freezing plants. **Journal of Food Safety**, v. 2, n. 2, p. 59-73, June 1980.

SANLUNKHE, D. K. ; DESAI, B. B. **Postharvest biotechnology of vegetables**. Florida: CRC, 1984.v. 1, 208p.

SAPERS, G.M. ; SIMMONS, G. F. Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v.52, n. 2, p. 48-52, 1998.

SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.S. Especificações para embalagens de vegetais minimamente processados (fresh cut). **Boletim Técnico do Centro Tecnológico de Embalagens, CETEA-ITAL**, v. 9, n. 5, p. 8, set./out. 1997.

SCHLIMME, D.V. Marketing lightly processed fruits and vegetables. **Hort Science**, v. 30, n.1, p.15-17, 1995.

SCOTT, V. N. Interaction of factors to control microbial spoilage of refrigerated foods. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 6, p. 431-435, 1989.

SENESI, E. et al. Physicochemical and microbiological changes in fresh-cut green bell peppers as affected by packaging and storage. **Italian Journal of Food Science**, v.12, n.1, p.55-64, 2000.

SENESI, E.; GALVIS, A. ; FUMAGALLI, G. Quality indexes and internal atmosphere of packaged fresh-cut pears (Abate fetal and Kaiser varieties). **Italian Journal of Food Science**, v.11, n.2, p.11-120, 1999.

SEO, K. H.; FRANK, J.F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine Treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 1, p. 3-9, Jan. 1999.

SHAPIRO, R. et al. Salmonella Thompson associated with improper handling of roast beef at a restaurant in Sioux Falls, South Dakota. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 2, p. 118-122, Feb. 1999.

SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.4, p.1347-1353, Apr. 2000.

SHEWFELT, R. L. Post harvest treatment for extending the shelf life of fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 40, n. 5, p.70-80, 1986.

SHEWFELT, R.L. Quality of minimally processed fruits and vegetables. **Journal of Food Quality**, v. 10, p.143-156, 1987.

SILVA Jr., E. A et al. Observação das características sensoriais e determinação das contagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em amostras de vegetais, quando submetidos a pressões reduzidas (vácuo) e baixos teores de oxigênio, em recipientes rígidos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 33, p. 27-31, set. 1994.

SILVA, N. da ; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela., 1997. 295p.

SPERBER, W. H.; TATINI, S. R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, v.29, p.502-505, 1975.

SPLITTOESSER, D. F.et al. Coliform content of frozen blanched vegetables packed in the United States. **Journal of Food Safety**, v.2, n.1, p.1-11, July 1980.

SPLITTSTOSSER, D. F. Predominant microorganisms on raw plant foods. **Journal Milk Food Technology**, v.33, p.500-505, 1970.

SPLITTSTOSSER, D. F. The microbiology of frozen vegetables: how they get contaminated and which organisms predominate. **Food Technology**, v.27, n.1, p. 54-60, Jan. 1973.

STILES, M.E.; NG, K. Use of Baird-Parker's medium to enumerate *Staphylococcus aureus* in meats. **Journal of Food Protection**, v. 44, n. 8, p. 583-587, Aug. 1981.

SU, Y-C.; WONG, A.C.L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v.60, n.2, p.195-202, 1997.

SUSLOW, T. Microbial food safety is your responsibility! **Vegetable Biotechnology**, p. 1-7, Jan 1999. Disponível em: <<http://vric.ucdavis.edu/vrichoml/html/foodsafety/foodsafety.htm>> Acesso em: 03 abr. 1999.

TAKEUCHI, K. ; FRANK, J.F. Penetration of *Escherichia coli* O157: H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. **Journal of Food Protection**, v. 63,n.4, p.434-440, Apr. 2000.

TSEN, H.Y.; JU, G. K.; LIN, I.T. Plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis for type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from foods. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 2, p. 147-153, Feb. 1995.

UNGAR, M. L.; GERMANO, M.L.S.; GERMANO, P.M.L. Riscos e consequências da manipulação de alimentos para a saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**, v. 6, n. 21, p. 14-17, 1992.

VAROQUAUX, P.; MAZOLLIER, J.; ALBAGNAC, G. The influence of raw material characteristic on the storage life of fresh-cut butterhead lettuce. **Postharves Biology and Thecnology**, v.9, p.127-139, 1996.

VASCONCELLOS, F. J. M. de; RABINOVITCH, L. A new formula for an alternative medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in foods. **Journal of Food Protection**. v.58, n.3, p.235-238, Mar.1995.

WAGNER JR., A. B. **Bacterial food poisoning**. Extension food technology. Texas Agricultural Extension Service. 7 p.Disponível em:<<http://aggiehorticulture.tamu.edu/extension/poison.html>> Acesso em: 03 jan. 1999.

WATADA, A. E.; ABE, K. ; YAMUCHI, N. Physiological activities of partially processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v.44, n.5, p.116-122, May 1990.

WATADA, A.; KO, N. P. ; MINOTT, A. Factores affecting quality of fresh-cut horticultural products. **Postharvest Biology and Tecnology**, v. 9, p. 115-125, 1996.

WEICHMANN, J. **Postharvest physiology of vegetables**. New York: Marcel Dekker, 1987. 597p.

WIGGINTON, M.J. Effects of temperature, oxygen tension and relative humidity on the wound-healing process in the potato tuben. **Potato Research**, v.17, p.200-214, Feb. 1974.

WILEY, R. C. **Frutas y hortalizas minimamente processadas y refrigeradas**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1997. 362 p.

WILSON, C. L. ; WISNIEWSKI, M. E. Biological control of post harvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review Phitopathology**, n. 27, p. 425-41, 1989.

ZHANG, S. ; FARBER, J. M. The effects of various desinfectantes against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. **Food Microbiology**, v.13, p.311-321, 1996.

ZHOU, Y. F. Abe ; IWATA, T. Effect of shredding modes on the deterioration of the quality of partially processed pepper fruits. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v. 39, p.161-166, 1992.

ZOTTOLA, E. A. ; SMITH, L. B. The microbiology of foodborne disease outbreaks: an update. **Journal of Food Safety**, v. 11, n.8, p. 13-29, Aug. 1990.

CAPÍTULO 2

Indicadores de contaminação ambiental e de condições higiênicas insatisfatórias de processamento (mesófilos totais, psicrotróficos, bolores e leveduras, coliformes) em hortaliças minimamente processadas

1 Resumo

ROSA, Odívia Oliveira. Indicadores de contaminação ambiental e de condições higiênicas insatisfatórias de processamento (mesófilos totais, psicotróficos, bolores e leveduras, e coliformes totais) em hortaliças minimamente processadas. In: _____. **Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados**. 2002. p.101-141. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Amostras de hortaliças e saladas mistas de diversas marcas foram obtidas em supermercados de Belo Horizonte, MG e Campinas, SP no dia de fabricação. As análises foram realizadas na data de fabricação e no prazo máximo de validade de cada produto, objetivando relacionar a população microbiana inicial com o tempo de armazenamento e segurança do produto para o consumo. Os resultados obtidos mostraram que de 140 amostras analisadas no dia de fabricação, 94% apresentaram contagens $>10^5$ UFC ^{-1}g para mesófilos e 100% para psicotróficos. Destes, 23,5% e 17,6% foram $>10^7$ UFC g^{-1} , respectivamente. As contagens de bolores e leveduras mostram-se 70,59% acima do padrão de 10^2 UFC g^{-1} , tendo 58,8% apresentado contagens $>10^4$ UFC ^{-1}g . Apenas 29,4% das amostras mostraram índices <3 NMP g^{-1} para coliformes fecais, sendo que 64,7% demonstraram contaminação fecal. As amostras de salsão, beterraba, cenoura e tri-salada indicaram contagens superiores a 2.400 NMP g^{-1} ao final do armazenamento. Dentre os produtos analisados, apenas acelga, escarola, espinafre, alface crespa e alface romana não foram positivas para *Escherichia coli*. Após 5 a 8 dias de armazenamento sob as condições de refrigeração indicadas pelos fabricantes, as amostras foram analisadas, verificando-se que as contagens para os indicadores selecionados eram superiores, demonstrando crescimento microbiano durante a estocagem. Os percentuais das amostras que mostraram contagens finais superiores, quando comparadas às iniciais foram: 41,18% para CPP; 76,5% para psicotróficos, 41,2% para bolores e leveduras; 27,3% para coliformes fecais. As análises mostraram que as grandes populações microbianas iniciais comprometeram a qualidade dos produtos, oferecendo riscos de proliferação dos microrganismos e, conseqüentemente, deterioração dos mesmos. O armazenamento sob refrigeração foi seletivo para organismos psicotróficos que afetam não só o armazenamento, mas também aumentam o

* Orientadora: Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Orientadora)

risco de toxinfecção por *Listeria monocytogenes* quando presentes. Pois estes continuam crescendo. As altas taxas de *E. coli* sugerem riscos de toxinfecção alimentar.

2 Abstract

ROSA, Odívia Oliveira. Microorganisms indicator of storage and processing conditions (mesophilic and psychrotrophic aerobic bacteria, molds e yeasts, total coliforms) of minimally processed fresh vegetables. In: _____. **Microbial flora associated to alterations in fresh-cut vegetables during the commercialization in supermarkets.** 2002. p.101-141 (Thesis – Doctorate in Food Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Samples of vegetables and mixed salad of several marks were obtained in supermarkets of Belo Horizonte and Campinas/Brazil in the manufacture day. The analyses were accomplished in the day of production and in the maximum period of validity of each product, objectifying to relate the initial microbial population with the time of storage and safety of the product for the consumption. The obtained results showed that of 140 samples analyzed in the day of production 94% they presented counts $>10^5$ CFU g^{-1} for mesophilic and 100% for psychrotrophic, and of 23,5% and 17,6% they were $>10^7$ CFU g^{-1} respectively. The molds and yeasts counts are 70,59% shown above the pattern of 10^2 CFU g^{-1} , where 58,8% presented counts $>10^4$ CFU g^{-1} . 29,4% of the samples just showed indexes <3 MPN g^{-1} for fecal coliforms, and 64,7% demonstrated fecal contamination where only big parsley, beltroot, carrot and trio salad are superior counts to 2400 MPN g^{-1} . The products analyzed endive, curly lettuce and roman lettuce were not just positive for *Escherichia coli*. After 5-8 days of storage under the suitable conditions of refrigeration for the makers, the samples were analyzed being verified that the counts for the selected indicators was superior, demonstrating microbial growth during the storage. The percentile of the samples that showed superior last counts when compared to the initials they were: 41,18% for mesophilic, 76,5% for psychrotrophic, 41,2% for molds and yeasts, and 27,3% for fecal coliforms. The analyses showed that great initials microbial populations commit the quality of the fresh product, offering proliferation risks and consequently deterioration of the product. Storages under refrigeration will be selective for organisms psychrotrophics that affect not only the storage but they also increase the risk foodborne for *Listeria monocytogenes* when presents, once these continue growing in the temperatures recommended for conservation of the products by the makers. The discharges rates of *E. coli* suggest risks of disease alimentary .

* Adviser: Ds Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Adviser)

3 Introdução

Nos últimos anos, a incidência de enfermidades veiculadas por alimentos assim como relatos de surtos de toxinfecções alimentares, atraiu crescente publicidade juntamente com a demanda de normas para reduzir este índice, pela cuidadosa aplicação dos princípios básicos de higiene dos alimentos. As gastroenterites ou doenças veiculadas por alimentos, denominadas de toxinfecções alimentares, são o resultado do consumo de alimentos contaminados com bactérias patogênicas e/ou suas toxinas, vírus, parasitos, substâncias químicas ou outras substâncias perigosas à saúde humana. As formas de assegurar que os alimentos sejam seguros ao consumo são bem conhecidas. Contudo, a alta incidência de enfermidades gastrointestinais não demonstra nenhum sinal de que as mesmas estejam sendo aplicadas. A principal razão apontada por vários autores é decorrente da forma branda com que se apresentam determinadas infecções intestinais que, em alguns casos, não necessitam de socorro médico, além das infecções assintomáticas que não são diagnosticadas com exames de rotina. Por outro lado, um sintoma ou caso isolado não pode ser registrado como surto de enfermidade alimentar. Contudo, cada um deve ser considerado como uma instância em que o alimento contaminado que causou a infecção pode, em certas circunstâncias, transmitir, pela excreção, o agente causal a outros produtos.

As condições de armazenamento são aspectos que podem afetar tanto a população final como os tipos de microrganismos que crescem em produtos frescos. Por isso, a influência das embalagens e condições de armazenamento sobre os microrganismos precisa ser notada. A temperatura e umidade relativa dentro da embalagem são, provavelmente, os dois fatores mais importantes que incidem sobre o efeito da estocagem na microbiota. Os microrganismos podem

crescer rapidamente durante o armazenamento, se mantidos em temperaturas elevadas. Por outro lado, temperaturas de refrigeração nem sempre retardam totalmente o crescimento destes, produzindo assim alterações microbianas que conduzirão à perda de qualidade e deterioração.

Produtos vegetais vêm normalmente sendo comercializados parcialmente processados. As hortaliças, como alface, almeirão, rúcula, acelga, agrião, espinafre, escarola, repolho, salsão, etc., são escolhidas. Algumas folhas e/ou talos defeituosos são removidos, fracionados ou não, lavados e higienizados em solução de cloro (± 120 a 150 ppm), empacotados ou não a vácuo individualmente ou sob a forma de saladas mistas, refrigeradas (5 a 10°C), e dispostas nos supermercados para o consumo doméstico.

De acordo com Floros (1993), antes da colheita, quando as frutas e hortaliças frutificam e ainda estão presas à planta de origem, as perdas devido a respiração e transpiração são substituídas pelo aporte de água e minerais e fotossíntese pela planta. Após a colheita, quando são removidas da planta, estas perdas não são substituídas, ocorrendo desidratação e deterioração. Estas mudanças fisiológicas de respiração, transpiração e biossíntese são afetadas por desordens metabólicas de fatores intrínsecos, climatéricos e não climatéricos. Também por fatores extrínsecos, como temperatura, umidade relativa, concentrações de etileno, O_2 e CO_2 , que, em geral, causam declínio da qualidade e limitam a vida útil desses produtos. Além das mudanças fisiológicas, podem ocorrer, devido às trocas enzimáticas, reações químicas e ação microbiana. Estas podem causar amolecimento dos tecidos, perda do "flavor", perda de pigmentos e mudança de cor, ocasionando um declínio global do valor nutricional, aparência e sabor dos produtos.

A deterioração microbiana contribui significativamente para o declínio da qualidade dos produtos vegetais e pode ter importantes implicações na segurança para o consumo. Por outro lado, a extensão da contaminação

microbiana depende do produto, índice da população inicial, manipulação, condições de processamento e empacotamento, e do ambiente de armazenamento. Os efeitos da atmosfera controlada (CA) são relatados como uma forma de reduzir a atividade microbiana dos produtos minimamente processados hermeticamente embalados. Babic & Watada (1996) realizaram estudos utilizando baixos teores de O₂ e alto de CO₂ para controlar o crescimento de microrganismos deteriorantes em espinafre. Considerando que, geralmente, baixas concentrações de oxigênio ou altas concentrações de gás carbônico diminuem a taxa respiratória, reduz-se assim o número de patógenos da planta após a colheita e, conseqüentemente, a taxa de deterioração do produto. Entretanto, pouca informação está disponível sobre os efeitos da CA sobre os microrganismos em produtos minimamente processados.

O presente trabalho teve por objetivo determinar o índice de contaminação em hortaliças e saladas mistas minimamente processadas, pela determinação de indicadores de contaminação ambiental e de condições higiênicas de processamento insatisfatórias. Pretende-se alertar os órgãos de segurança e saúde quanto ao risco do consumo destes produtos sem um rígido controle de higiene e desinfecção.

4 Materiais e Métodos

4.1 Coleta de amostras

Um total de 140 amostras de produtos hortícolas minimamente processados, como alface, almeirão, acelga, agrião, escarola, espinafre, rúcula, salsão, broto de alfafa, cenoura, beterraba e saladas mistas minimamente processadas (Tabela 1), foram coletadas em supermercados das cidades de Belo Horizonte-MG e Campinas, SP, na data de fabricação. Foram mantidas sob refrigeração ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante o prazo de validade do produto expresso na embalagem (5 a 8 dias). As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, MG (DCA-UFLA).

TABELA 1 Composição das saladas mistas minimamente processadas

Salada	Ingredientes
Clássica (para preparo de Tepanyaki)	Brócolis, couve-flor, salsão, cenoura, acelga, repolho e sache com molho.
Brisa	Alface americana, radichio, tomate cereja, cenoura palha e endíria com sache para molho da marca Hellman's
Primavera	Agrião, alface americana e radichio
Tri-salada	Acelga fatiada, cenoura e beterraba ralados

Foram realizadas duas determinações. Uma na data de fabricação e outra no último dia do prazo de validade do produto. O objetivo era determinar a carga microbiana inicial dos produtos e o aumento populacional durante o

armazenamento sob refrigeração. Estas determinações norteariam a suspeita de deterioração do produto e riscos de toxinfecção alimentar quando altas contagens iniciais fossem detectadas, assim como a presença de contaminantes fecais indicativo de risco da presença de patógenos.

4.2 Análises microbiológicas

25 g de amostra foi homogeneizado em 225 ml de água peptonada (0,1% de peptona e 0,85% de NaCl) e realizadas diluições decimais em séries consecutivas para proceder às análises microbiológicas.

Foram realizadas contagens globais de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotólicas, utilizando ágar padrão para contagens (PCA); contagem total de bolores e leveduras pelo plaqueamento em ágar batata dextrose (BDA) e além da determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais, utilizando séries de tubos de lauryl sulfato triptose, seguidas de repicagem em caldo *Escherichia coli* (LST e EC, respectivamente) segundo Mac-Faddin, (1980), "International Commission on Microbiological Specification for Foods Method (ICMSF, 1983), "American Public Health Association" (APHA, 1992), Bergey's manual (1994) e Silva et al. (1997). Para estabelecer as condições higiênico-sanitárias de fabricação dos produtos, os resultados foram comparados aos padrões microbiológicos para alimentos, estabelecidos na Resolução RDC nº12 (Brasil, 2001) Portaria nº451 (Brasil, 1997) e regulamentações internacionais disponíveis (AOAC, 1995; FDA, 1995, 1998; ICMSF, 1998; CDC, 1998).

O isolamento e identificação de *Escherichia coli* foi realizado em ágar eosina azul de metileno segundo Levine (EMB) e a identificação bioquímica pelo sistema API20E (BioMerieux).

5 Resultados e Discussões

As contagens microbianas podem se encontrar afetadas por fatores extrínsecos. Isso ocorre porque os vegetais podem estar contaminados com terra, além do quê, as condições ambientais, imediatamente antes ou durante a coleta, podem influir no número e tipo de microrganismos presentes. As contagens totais de bactérias em hortaliças são utilizadas como parâmetro para dar uma idéia da carga microbiana. Porém, não indica se a população tem efeito benéfico ou prejudicial. Contudo, servem como um alerta das condições de higiene durante manipulação e armazenamento das mesmas, como também dos riscos oferecidos à saúde do consumidor (ICMSF, 1985; Hobbs, 1986; Zottola & Smith, 1990; Hotchkiss & Banco, 1992; Madden, 1992; Brasil, 1997; CDC, 1998).

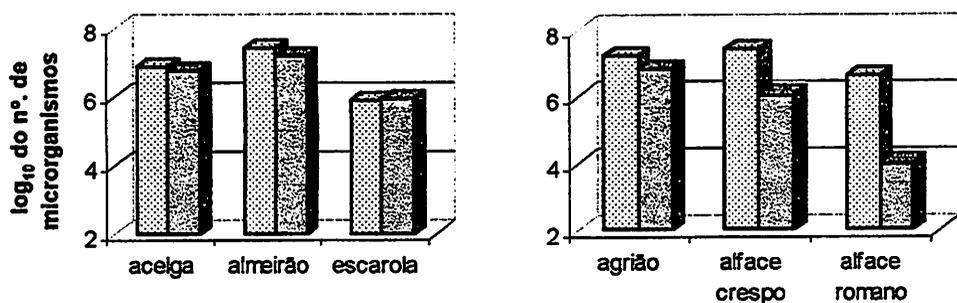
A Figura 1 representa as variações médias de contagens globais de bactérias aeróbias mesófilas (\log_{10}) obtidas de hortaliças folhosas minimamente processadas de diferentes marcas, na data de fabricação e após armazenamento, sob refrigeração a $7\pm 1^\circ\text{C}$. Os índices iniciais de contagens globais de bactérias aeróbias mesófilas obtidas nas análises destes produtos variaram entre 10^5 a 10^7 UFC g^{-1} , enquanto as contagens finais alcançaram até 10^8 UFC g^{-1} . Estes índices refletem as más condições de manuseio e processamento com que estes produtos foram tratados.

Enquanto nas amostras de agrião, alface crespa e alface romana (Figura 1b) os números finais foram reduzidos após este período, nas amostras de acelga, almeirão e escarola, observa-se uma pequena variação das contagens dentro de um mesmo ciclo log. (Figura 1a). Na Figura 1c, pode-se notar que algumas amostras, como espinafre, broto de alfafa, rúcula e salsão, apresentaram aumento nas contagens finais de um a dois ciclos log.

Considerando ainda o número total de amostras de hortaliças folhosas

analisadas quanto à presença de bactérias aeróbias mesófilas, verifica-se que 94,12% das amostras apresentaram contagens iniciais $>10^5$ UFC/g com índices entre $4,3 \times 10^5$ a $7,5 \times 10^7$ UFC g⁻¹. Desse total, 23,53% apresentaram contagens superiores a 10^7 UFCg⁻¹ (Figura 2).

As condições de embalagem e temperatura de armazenamento são apontadas como fatores determinantes para seleção e crescimento da microbiota (Splittoesser, 1973; Bolin et al., 1977; Brecht, 1980; Deak, 1984; Bolin & Huxsoll, 1989, 1991, Barriga et al., 1991; Hotckiss & Banco, 1992; Brackett, 1992; Babic & Watada, 1996; Bennik et al., 1996; Hobbs, 1999; McIngvale et al., 2000). Assim, pode-se afirmar que as temperaturas de transporte e comercialização dos produtos analisados pode ter influenciado nas altas contagens iniciais e, conseqüentemente, nas contagens após armazenamento, uma vez que contagens iniciais elevadas normalmente refletem a qualidade microbiológica do produto final.



(c) Aumento nas contagens finais (log₁₀)

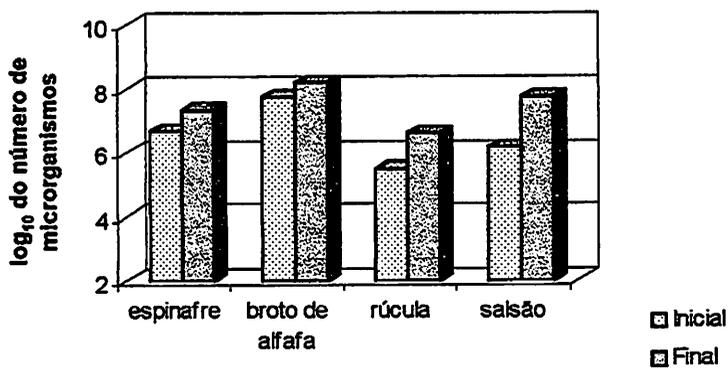


FIGURA 1 Variações nas contagens iniciais e finais de bactérias aeróbias mesófilas (log₁₀) em hortaliças minimamente processadas

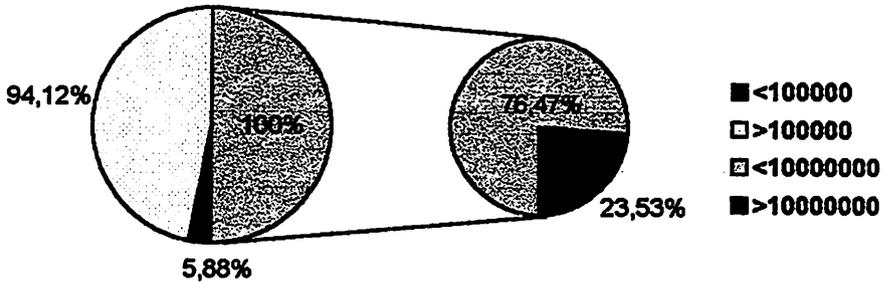


FIGURA 2 Percentual de amostras de hortaliças MP em diferentes faixas de contagens de bactérias aeróbias mesófilas

Por outro lado, produtos como agrião, alface crespo e alface romana, que tiveram seus índices reduzidos, provavelmente sofreram interferência das condições de aeração, considerando que estes foram embalados a vácuo parcial.

De acordo com vários autores, as embalagens sob condições de atmosfera modificada e/ou controlada são eficientes para manter ou melhorar a qualidade visual e organoléptica, além de reduzir consideravelmente o número de microrganismos (Bolin et al., 1977; Brecht, 1980; Deak, 1984; Bolin & Huxsoll, 1989; Barriga et al., 1991; King Jr. et al., 1991; Hotckiss & Banco, 1992; Brackett, 1992, 1994; Babic & Watada, 1996; Bennik et al., 1996, Hobbs, 1999). Entretanto, Nguyen-the & Carlin (1994) afirmam que seus efeitos sobre os microrganismos são inconsistentes, uma vez que, embora possam reduzir parcialmente o número destes, exercem um efeito seletivo na microbiota, permitindo o desenvolvimento de organismos anaeróbios, facultativos e microaerófilos, determinando muitas vezes a seleção de microrganismos patogênicos.

Senesis et al. (2000) informam que as altas concentrações de CO₂ e etileno ocorridas em 7º e 11º dias de estocagem de pimentões verdes MP, sob atmosfera modificada passiva, ocasionaram rápida proliferação de

microrganismos incluindo bactérias ácido lácticas. As contagens totais de microrganismos alcançaram índices $>10^7$ – 10^8 UFC g⁻¹, após sete dias de estocagem a $8\pm 1^\circ\text{C}$.

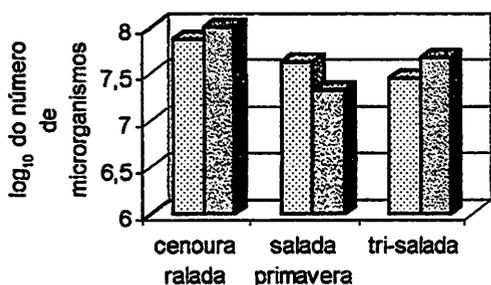
Ainda em pesquisa realizada por Babic e Watada (1996), para verificar o efeito da atmosfera controlada (CA) nas populações microbianas em folhas de espinafre "fresh-cut", foi demonstrado que estas aumentaram durante o armazenamento tanto em atmosfera passiva como em CA a 5°C e 10°C . Observam os autores que o número inicial de microrganismos variou entre 10^7 e 10^8 UFC g⁻¹ para mesófilos, psicrófilos e *Pseudomonadaceae*; aproximadamente 10^3 UFC g⁻¹ para o total de *Enterobacteriaceae* cultivadas a 37°C e entre 10^3 e 10^4 UFC g⁻¹ para *Microcaceae*. Assim, embora seja observada uma redução no número de bactérias aeróbias mesófilas, os índices finais de 10^6 UFCg⁻¹ nas amostras de agrião e alface crespo são preocupantes.

O mesmo pode-se considerar com relação às temperaturas. O bom controle das temperaturas de refrigeração limita o crescimento e a deterioração microbiana, embora frutos e hortaliças MP possam abrigar uma microbiota psicrotrófica, como *Pseudomonas fluorescens* ou mesmo *Listeria monocytogenes* (Splittoesser, 1964; Splittoesser & Wettergreen, 1973; Pripke et al., 1976; Splittoesser et al., 1980; Bolin, 1989; Corlett, 1989; Mohd-Som et al., 1994; Nguyen-the & Carlin, 1994; Palumbo et al., 1995; Beuchat, 1996; Wiley, 1997; Brackett, 1994; Ayhan et al., 1998; Gorny, et al., 1998; Freire Jr., 1999; Hobbs, 1999; McIngvale et al., 2000).

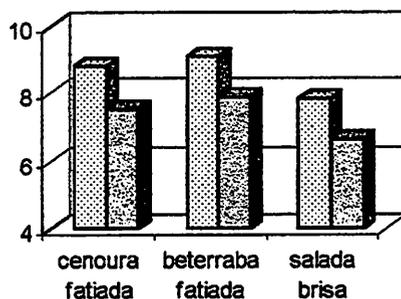
Nos locais de comercialização, observa-se práticas inadequadas de temperatura para conservação destes produtos, variando entre 18 e 22°C quando são recomendadas temperaturas entre 4 e 10°C . A exposição de produtos frescos a temperaturas $>10^\circ\text{C}$ pode ter ocasionado a multiplicação de bactérias mesófilas e psicrotróficas que determinam as variações das contagens finais nos produtos estudados.

As mesmas considerações podem ser aplicadas aos resultados das amostras observadas nas Figuras 3 a, b e c, em que os índices iniciais variaram de 10^6 a 10^9 UFC g^{-1} e os índices finais de 10^6 – 10^8 UFC g^{-1} . Houve redução de 1 a 2 ciclos log para as amostras de cenoura fatiada, beterraba fatiada e salada brisa e aumento de 1 ciclo log para as amostras de cenoura em tirinha e salada clássica. Estes aumentos nas contagens após armazenamento, estão associados aos processos metabólicos normais de maturação dos vegetais que irão favorecer o crescimento e a multiplicação da microbiota inicialmente presente no produto. Estes aumentos nas contagens após armazenamento estão associados aos processos metabólicos normais de maturação dos vegetais que irão favorecer o crescimento e a multiplicação da microbiota inicialmente presente nos produtos.

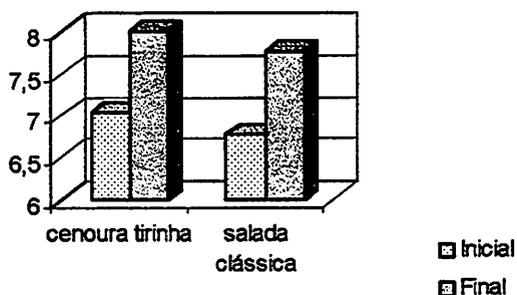
Embora a composição da microbiota inicial de frutos e hortaliças não possa ser antecipada, uma microbiota característica está presente e é possível para quase todos organismos estarem presentes em algum momento, desde a coleta até a distribuição ao consumidor (Brackett, 1994; Chapman, 1995). Usualmente, são as bactérias Gram-negativas que são mais frequentemente isoladas de hortaliças frescas. Os gêneros geralmente mais isolados são citados pelo autor, como sendo *Pseudomonas*, *Erwinia* e *Enterobacter*, embora bactérias Gram-positivas como *Bacillus* e as bactérias corineformes também normalmente se encontrem presentes. Splittoesser & Wettergreen (1973) verificaram que bactérias Gram-positivas foram isoladas na maioria das amostras de ervilhas e feijões frescos. Também detectaram, em estudos com tomates frescos, proporções quase iguais de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em que *Flavobacterium* e *Pseudomonas* foram os gêneros mais comuns, juntamente com bactérias corineformes.



(a) Sem alterações significativas



(b) Redução das contagens finais



(c) Aumento das contagens finais (log₁₀)

FIGURA 3 Contagens globais médias de bactérias mesófilas (log₁₀) em hortaliças (raízes e tubérculos) e saladas mistas minimamente processadas.

Geralmente, não é constatada a presença de patógenos ao homem e outros animais em vegetais frescos. A não ser que estes sejam expostos a dejetos durante o plantio, a manipulação e o processamento. É citado por vários autores o risco durante a fertilização e irrigação, por presença de dejetos humanos e animais. Estes irão contribuir com a presença de agentes etiológicos de diversas enfermidades infecto-contagiosas e parasitárias que normalmente estariam ausentes (Hobbs, 1986; Eiroa, 1977; Bolin et al., 1977; Brackett, 1992;

Chapman, 1995; Hancock et al., 1997; Ho & Tam, 1997; Suslow, 1999; Bell & Kyriakides, 2000; Byamukama et al., 2000; Gagliardi & Karns, 2000).

Por isso, as contagens iniciais elevadas são um alerta para uma possível contaminação perigosa, refletindo as condições inadequadas de cultivo, coleta, manipulação, transporte, processamento e distribuição dos produtos minimamente processados.

As hortaliças crescem quase que exclusivamente em contato imediato com o solo, o qual tem grande influência nas contaminações com terra. As raízes e tubérculos, como cenouras, aipo e beterrabas, têm sempre grande quantidade de microrganismos do solo. Entre eles bactérias esporuladas muito resistentes, como dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*.

É importante esclarecer que a microbiota presente em produtos MP será influenciada por inúmeros fatores, destacando-se a manipulação intensa que sofrem, até a embalagem e comercialização. O trabalho manual requerido durante a colheita, seleção, classificação, lavagem, descasque, fracionamento e envase, assim como o contato com utensílios e equipamentos utilizados nestas operações, não só contribuem com o aumento da taxa microbiana, como também para a distribuição no produto e contaminação por uma microbiota patogênica que, em condições normais, geralmente não teria acesso a esses produtos (Foster, 1969; Bryan, 1974; Eiroa, 1977; Almeida, 1998; Hobbs, 1999).

Por outro lado, as lavagens aumentam as condições de umidade dos produtos, favorecendo a disseminação e proliferação das bactérias.

As hortaliças minimamente processadas são também apresentadas em forma de saladas mistas para consumo imediato. As taxas iniciais de bactérias mesófilas indicam a alta contaminação destes produtos. Índices superiores a 10^5 refletem o descuido e descaso durante o processamento e técnicas de higiene inadequadas, oferecendo risco da presença de patógenos, principalmente porque estes produtos são oferecidos para consumo cru. O risco de transmissão de

enfermidade alimentar torna-se, neste caso, eminente.

Pela inspeção visual, apenas a salada clássica para o preparo de tepanyaki apresentou algum grau de escurecimento num dos seus componentes após armazenamento sob refrigeração. Esse é um alerta para as condições inadequadas do produto para consumo.

A Figura 4 representa as médias de contagens de bactérias psicrotróficas aeróbias em produtos hortícolas folhosos MP, em que 100% das amostras mostraram contagens $>10^5$ UFC g^{-1} . Destas, 17,6% foram superiores a 10^7 UFC g^{-1} .

O aumento nas contagens após armazenamento sob refrigeração correspondeu a 40% das amostras, representando um aumento de 1 ciclo log do valor inicial.

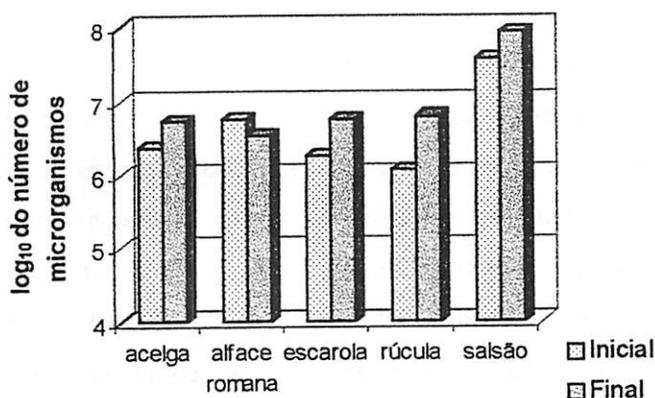
Embora as amostras de almeirão tenham apresentado redução das contagens iniciais, estas permaneceram acima de 10^6 UFC g^{-1} após estocagem, índices considerados altos para produtos a serem consumidos crus. Estes resultados estão de acordo aos encontrados por King Jr. et al. (1991), em estudos realizados com alface. Esses autores observaram que a desinfecção com cloro e o resfriamento não tiveram influência apreciável nas contagens microbianas de psicrotróficos.

Estudos realizados por Babic & Watada (1996) apresentaram números elevados de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas em espinafre após armazenamento sob refrigeração. Foi identificada principalmente, uma espécie pectinolítica, *Pseudomonas fluorescens*, como suspeita de ser o agente principal da deterioração em espinafres minimamente processados. A $5^{\circ}C$, mesófilos, psicrotróficos e *Pseudomonadaceae* aumentaram mais rapidamente em ar circulante quando comparado à CA. Depois de sete dias de armazenamento, os números alcançaram 10^{10} e 4×10^8 UFC g^{-1} em ar circulante, respectivamente para essas bactérias, quando eram de 10^8 e 6×10^7 UFC g^{-1} sob CA,

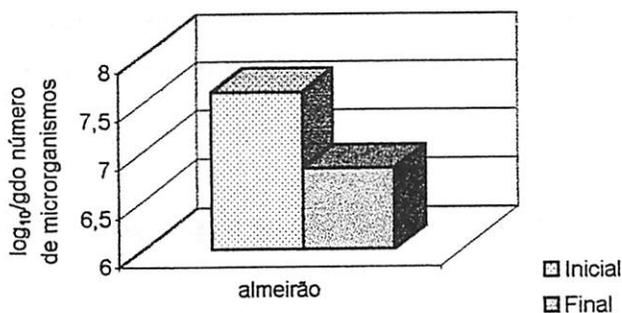
espectivamente (números significativamente diferentes a $p \leq 0,05$).

Segundo Bennik et al. (1996), existe uma preocupação de que patógenos frio-tolerantes específicos, como *Listeria monocytogenes*, que possam crescer sob baixas temperaturas e baixas condições de O_2 , podem proliferar a níveis perigosos durante o armazenamento em produtos minimamente processados.

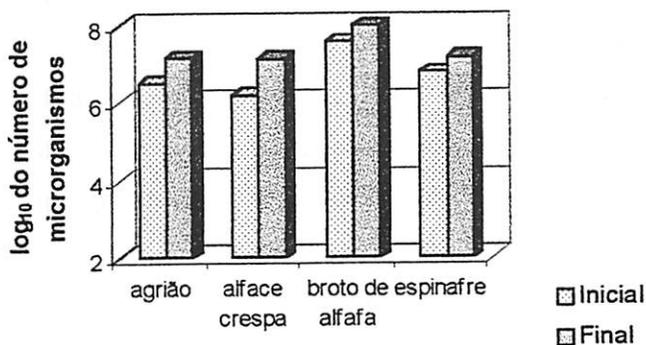
As contagens de bactérias psicrotólicas em cenouras, beterraba e saladas mistas MP de diferentes marcas, expressas na Figura 5, mostraram-se bastante elevadas, com índices iniciais de 10^6 à 10^9 UFC g^{-1} . Embora 25% das amostras tenham reduzido estes índices de 1 a 2 ciclos log (Figura 5b), todas as amostras mantiveram contagens finais $>10^7$ UFC g^{-1} . Este índice é considerado por vários autores como perigoso, não só por acelerar o processo de deterioração, como também por indicar risco da presença de bactérias patogênicas frio-tolerantes.



(a) Sem alterações significativas (log₁₀)



(b) Redução das contagens finais log₁₀



(c) Aumento das contagens finais (log₁₀)

FIGURA 4 Contagens médias de bactérias psicrotróficas (log₁₀) em hortaliças folhosas minimamente processadas.

As observações da Figura 5a mostram que as amostras de beterraba, salada primavera, tri-salada, salada clássica e salada brisa mantiveram índices de $\pm 10^7$ UFC g^{-1} não apresentando alterações significativas após armazenamento sob refrigeração. Na Figura 5c verifica-se que apenas as amostras de cenoura em tirinhas tiveram suas contagens aumentadas em 1 ciclo log, observando-se também índices finais em torno de 10^7 UFC g^{-1} . King et al. (1991) relatam que em amostras de alface que foram armazenadas comercialmente por duas semanas entre 2 a 8°C e reexaminadas para contagens, a população microbiana mesófila e psicrotrófica aumentou em todas as amostras.

Scott (1989) declaram que fatores como tempo e temperatura são particularmente importantes para a estabilidade microbiana e é, freqüentemente, a primeira barreira contra a deterioração. Entretanto, o abuso de temperatura não é incomum.

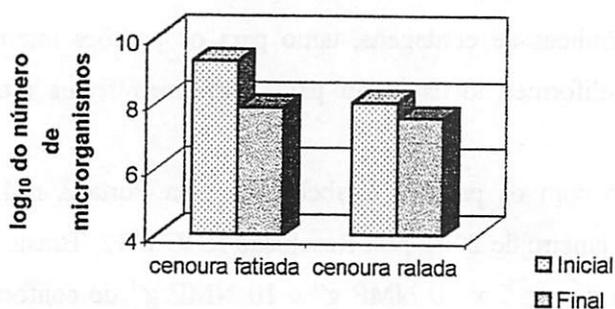
Ayhan et al. (1998) informam que durante a estocagem sob refrigeração, houve aumento da contagem total de psicrotróficos para amostras de melões lavadas e não lavadas, quando comparadas àquelas tratadas com cloro. Beuchat & Bracket (1990) declaram que as populações de psicrotróficos após 15 dias a 5°C geralmente excederam às contagens de microrganismos mesófilos aeróbios capazes de crescer a 30°C.

Pesquisa realizada por King Jr. et al. (1991), para verificar as condições de armazenamento de alfaces parcialmente processadas e determinar métodos para aumentar a vida útil destes produtos, demonstraram que as contagens aumentaram significativamente, até mesmo com temperaturas de armazenamento relativamente baixas. A habilidade das bactérias para multiplicar a baixas temperaturas indicou a sua habilidade potencial para causar deterioração nas amostras de alface analisadas.

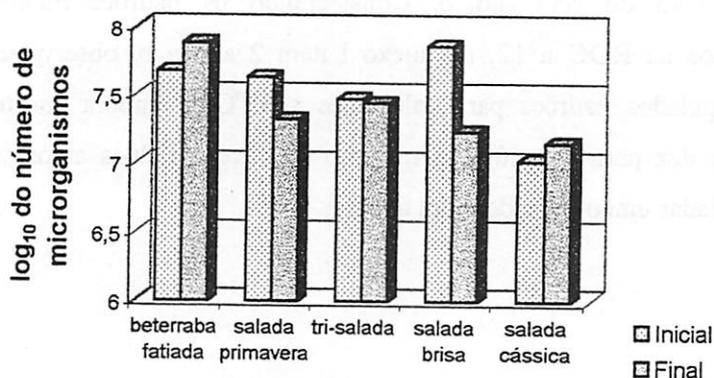
As determinações para coliformes fecais expressas nas Figuras 6a e 6b, mostraram que estas contagens variaram de <3 a >2400 NMP g^{-1} . Amostras de

salsão e broto de alface destacaram-se como produtos altamente contaminados, ultrapassando os índices de contagens, tanto para os padrões internacionais e nacionais, para coliformes totais como para coliformes fecais (coliformes a 45°C).

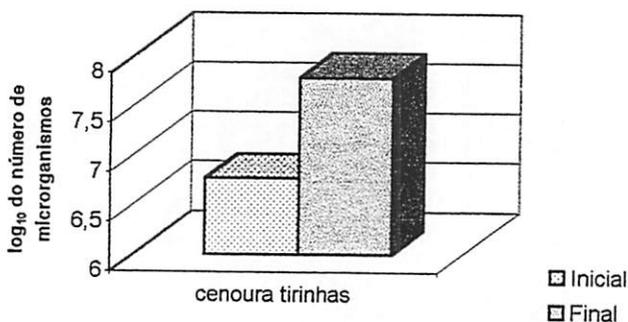
De acordo com os padrões estabelecidos pela Portaria nº451 (Brasil, 1997), extinta em janeiro de 2001 pela Resolução RDC nº12 (Brasil, 2001), são permitidos índices de até 5×10 NMP g^{-1} e 10 NMP g^{-1} de coliformes fecais, respectivamente para verduras e legumes crus e saladas mistas prontas para o consumo, com ou sem molho. Considerando os padrões microbiológicos especificados na RDC nº12, no anexo I item 2 alínea b, observa-se que não foram estipulados padrões para coliformes a 45°C/g, embora conste o limite mínimo de dez para um número máximo aceitável de duas amostras quando forem coletadas cinco unidades para análise.



(a) Sem alterações significativas (log₁₀)



(b) Redução das contagens finais (log₁₀)



(c) Aumento das contagens finais (log₁₀)

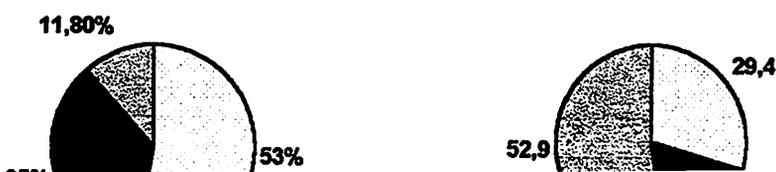
FIGURA 5 Médias de contagens de bactérias psicrotróficas em hortaliças (raízes e tubérculos) e saladas mistas minimamente processadas

Considerando-se este limite, pode-se afirmar que, das amostras analisadas, 53% apresentaram contagens iniciais acima do limite de 10 UFC g⁻¹, 11,8% entre 3 e 9 UFC g⁻¹ e 35% <3 UFC g⁻¹.

Comparando-se as contagens finais, verifica-se uma mudança nestes resultados: 29,4% tiveram suas contagens acima do limite mínimo de 10 UFC g⁻¹; 18% entre 3 e 9 UFC g⁻¹, enquanto 53% mostraram resultados <3, demonstrando uma redução nas contagens finais, provavelmente decorrente da temperatura de estocagem dos produtos (Figura 6a, b e c).

Observa-se, ainda, que as contagens obtidas para os produtos agrião, alface crespo, broto de alfafa, espinafre, rúcula e salsão, indicam uma contaminação fecal perigosa, oferecendo riscos da presença de organismos patogênicos e parasitos que irão comprometer a saúde do consumidor (dados não apresentados). Após o período de armazenamento sob refrigeração, observa-se que, 50% das amostras apresentadas na Figura 7 tiveram seus índices reduzidos, ao final do armazenamento, apenas a cenoura fatiada apresentou número inferior ao índice mínimo estipulado na RDC12/2001 e padrões da Portaria 451SVS/1997 para coliformes fecais.

condições de higiene, especificações microbianas e estocagem para produtos frescos processados, regulamentadas pelas Boas Práticas de Fabricações (GMP). Estas recomendações foram adaptadas e apresentadas por Nguyen-the e Carlin (1994). Nessas especificações, são indicados valores de 5x10⁵ UFC g⁻¹ a 5x10⁶ UFC g⁻¹ para contagens totais em saladas mistas e hortaliças fatiadas, e de 5x10⁷ UFC g⁻¹ para saladas prontas para o consumo. Para coliformes com crescimento à 44,5°C são indicados limites de boa qualidade de 10 UFC g⁻¹ a 10³ UFC g⁻¹ para



uma qualidade marginal aceitável. Para todos os produtos é recomendada a ausência de *Salmonella* sp. Em 25g, não constam especificações para psicrotróficos, bolores e leveduras.

Babic & Watada (1996), em seus experimentos, estimaram que coliformes e bactérias ácido-lácticas permaneceram abaixo do limite de 60 UFC g⁻¹ durante todo o período de armazenamento. Estes índices foram perigosos para determinação de uma microbiota patogena nos produtos analisados.

Pesquisa realizada por Del Rosario & Beuchat (1995) em amostras de melão "cantaloupe" e melancia, utilizando cepas de *E. coli* O157:H7, demonstraram um aumento significativo da população inicial entre 4 a 6 horas de 6,61 log₁₀ UFC g⁻¹ para cantaloupe e de 8,51 log₁₀ UFC g⁻¹ para melancia, após 28 horas de incubação. Embora o número de *E. coli* O157:H7 detectado a 5°C não tenha sido significativo após 34 horas. Estudos semelhantes realizados por Golden et al. (1993) utilizando *Salmonella* sp nos mesmos produtos à mesma temperatura, foram similares a esta pesquisa, embora incubações a 23°C/24 horas demonstrem um rápido crescimento deste agente.

Verifica-se, assim, que as temperaturas recomendadas pelos produtores para conservação dos produtos minimamente processados não são suficientes para parar ou mesmo reduzir o crescimento destes microrganismos. Principalmente quando práticas inadequadas de higiene e desinfecção são utilizadas determinando a permanência de contagens microbianas iniciais altas em produtos destinados ao consumo cru. Estes resultados nos levam a crer que as concentrações de hipoclorito comumente utilizadas na higienização não foram adequadas para eliminação de bactérias oriundas do local de colheita, agregadas durante o transporte, manuseio e preparo. Além disso, as condições de embalagem foram favoráveis à multiplicação não só da microbiota epífita como patogena. Vale ressaltar que, em estudos conduzidos por McIngvale et al. (2000), para verificar os efeitos das grandes variações que podem ocorrer nas

faixas de temperaturas (entre 5° e 12°C) utilizadas durante o transporte ou estocagem inadequadas, detectou-se que as temperaturas utilizadas aparentemente não tiveram efeito sobre a sobrevivência da *Escherichia coli* O157:H7.

As práticas de temperaturas abusivas durante a comercialização dos produtos podem ter influenciado nas altas contagens de indicadores fecais e ambientais, como coliformes totais e coliformes a 45°C. Pois as temperaturas observadas nos supermercados variaram entre 18° a 22°C. O mesmo pode ser discutido quanto as práticas utilizadas durante a produção.

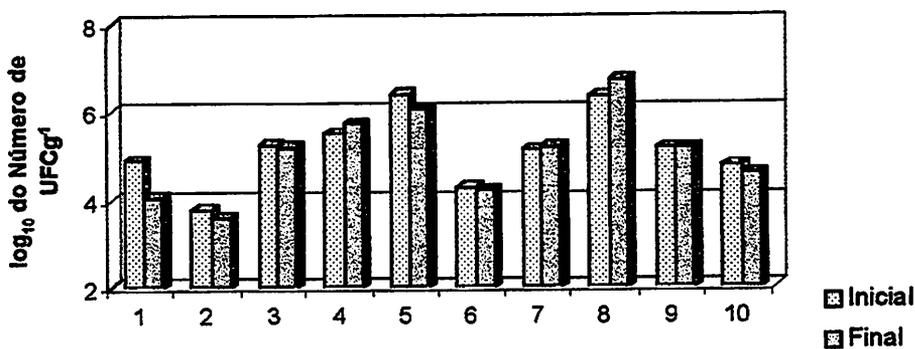
De acordo com Brackett (1994), tanto as leveduras como os fungos filamentosos são normalmente isolados de hortaliças frescas, embora pouca informação se disponha sobre as leveduras. Distintas espécies de leveduras basidiomicetos não fermentativas, principalmente *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, e leveduras fermentativas, tais como *Candida* e *Kloeckera*, são citadas pelo autor como parte da microbiota normal de frutas e hortaliças frescas. Esclarece ainda que as contagens de leveduras podem oscilar de $<10^3$ a $>10^6$ células/g de tecido e que obter estimativas fidedignas de leveduras na maioria dos produtos vegetais é difícil, uma vez que os artigos publicados normalmente indicam apenas contagens totais de fungos. Dentre as leveduras, King et al. (1991), indicam *Cryptococcus*, *Pichia*, *Torulaspora* e *Trichosporon spp* como as mais freqüentemente isoladas.

Em nossos estudos, as contagens totais de bolores e leveduras (Figura 8) revelaram que 70,59% apresentaram contagens $>10^4$ UFC g⁻¹, tendo 11,7% mostraram índices $>10^6$ UFC g⁻¹. Estes níveis são considerados de alto risco para a produção de toxinas. Das amostras analisadas, 17,65% alcançaram aumento na ordem de 1 a 2 ciclos log dos valores iniciais e 11,76% de redução nas contagens na ordem de 1 a 2 ciclos log. Para acelga e alface crespa, respectivamente.

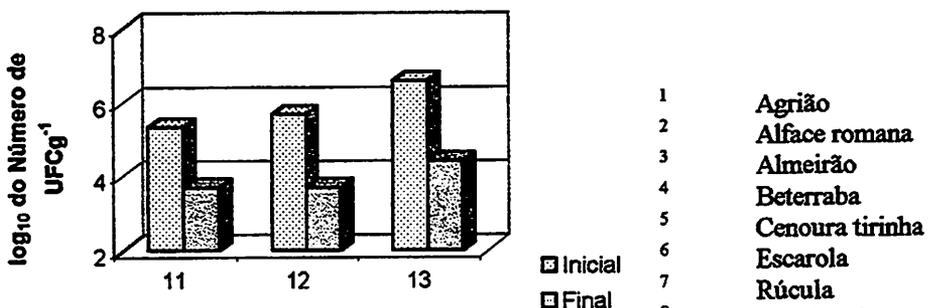
Dentre as espécies mais isoladas no trabalho, destacam-se *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp. e *Trichoderma* sp. Webb & Mundt citados por Brackett (1994) destacam os gêneros *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Rhizopus* e *Phoma* como os mais comumente isolados em produtos vegetais, independente do cultivar, condições climáticas, localização de campos de colheita ou altura das hortaliças. Embora seja difícil estimar as contagens de fungos filamentosos, uma vez que estão sempre associadas às leveduras, os autores informam serem estas normalmente em concentrações inferiores às bactérias, estimando uma população de aproximadamente 10^4 UFC g^{-1} .

Embora não sejam especificados padrões para bolores e leveduras para produtos vegetais frescos prontos para o consumo na RDC n°12 (Brasil, 2001), recomendações são feitas para que os produtos vegetais apresentem índices $<10^2$, que irão refletir na qualidade final destes.

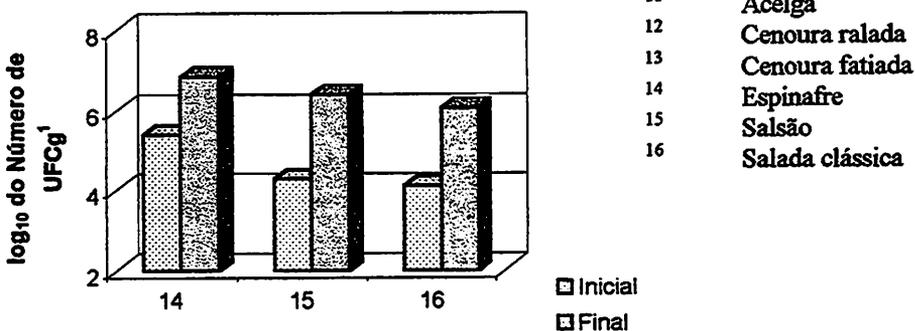
Nas citações de Babic & Watada (1996), as taxas de leveduras foram consideradas baixas quando permaneceram entre 10^3 - 10^4 UFC g^{-1} , durante todo o período de armazenamento, tanto em ar circulante como sob atmosfera controlada em ambas as temperaturas estudadas.



(a) Sem alterações significativas log₁₀



(b) Redução das contagens finais log₁₀



(c) Aumento das contagens log₁₀

FIGURA 8 Variações das contagens médias de bolores e leveduras em produtos hortícolas minimamente processados, comercializados nos municípios de Belo Horizonte, MG e Campinas, SP

King Jr. et al. (1991) informam que as contagens em ágar extrato de levedura glucose oxitetraciclina (OGY) para determinação do número de leveduras em alface, sempre foram mais baixas que as contagens em PCA (bactérias mesófilas), indicando inibição da flora de levedura quando em baixas temperaturas.

As contagens médias em cenoura, beterraba, salada brisa, salada primavera e tri-salada (Figura 8), embora inicialmente elevadas, mantiveram-se mais ou menos constantes durante o período de estocagem, não apresentando aumento ou redução significativa. As altas contagens de bolores e leveduras refletem principalmente as condições inadequadas de armazenamento dos produtos, uma vez que estes fazem parte de uma microbiota epífita oriunda do local de plantio destes vegetais. As condições de temperatura e manuseio durante a produção e transporte dos vegetais, assim como de umidade e aeração no interior das embalagens, irão determinar sua qualidade final.

Observando-se a Figura 9 é possível verificar que houve um aumento considerável durante o período de armazenamento sob refrigeração na temperatura recomendada pelos fabricantes. Este fato deve estar relacionado com as altas contagens iniciais encontradas nos produtos e que podem ter concorrido para um aumento na velocidade de crescimento da microbiota presente. É possível notar também que um percentual elevado de amostras não apresentou alterações significativas nas contagens finais. Daí pode-se presumir que, embora as temperaturas praticadas durante a comercialização possam inibir, ou até reduzir, a microbiota mesófila, um grande número de microrganismos psicrotróficos e/ou psicrotolerantes podem permanecer e até multiplicar nos produtos alcançando níveis perigosos. É sabido também que quando o crescimento microbiano chega a determinados índices, o uso de baixas temperaturas e as condições de embalagem tornam-se ineficientes para a inativação da microbiota e conseqüente deterioração.

Populações de 10^4 a 10^6 microrganismos/g são consideradas comuns em frutos e hortaliças quando estes estão presentes na planta de processamento, bancadas e utensílios. Estes índices são considerados aceitáveis desde que não estejam presentes patógenos toxígenos (Beuchat, 1996; Ayhan et al., 1998).

A redução de apenas uma a duas unidades log pode ser obtida pela lavagem com cloro. Várias experiências demonstram que, embora o banho com hipoclorito reduza significativamente a população inicial da microbiota natural de produtos vegetais, as populações finais de amostras tratadas e não tratadas não foram significativamente diferentes após o período de incubação sob refrigeração. Mesmo quando as contagens globais de aeróbios mesófilos mostraram-se reduzidas. Consideram, então, que pesquisas devem ser conduzidas com o objetivo de manter esta redução durante todo o período de estocagem (Beuchat, 1996; Nicholl & Prendergast, 1998).

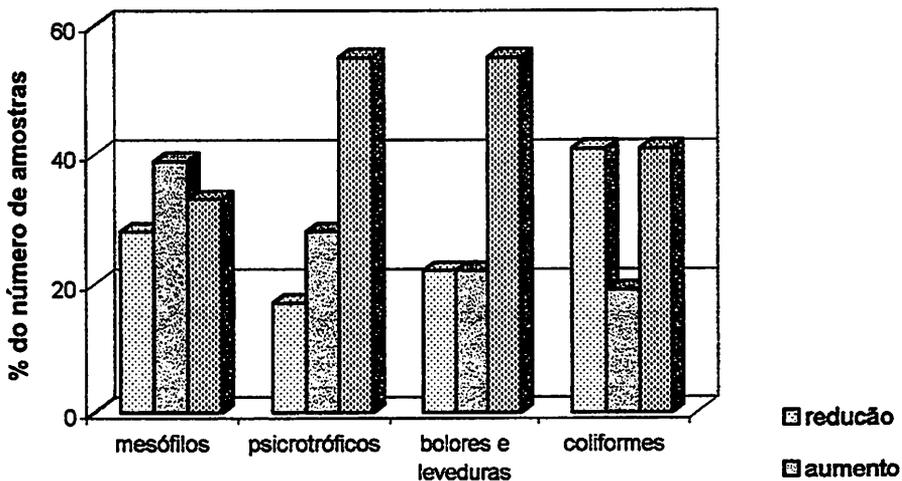


FIGURA 9 Variações percentuais entre as contagens iniciais e finais de microrganismos indicadores de contaminação ambiental e de processamento em produtos hortícolas minimamente processados

6 Conclusões

As contagens iniciais mostraram-se elevadas nas amostras analisadas em 94% para mesófilos, 100% para psicrotróficos, 64,7% para coliformes fecais e 70,59% para bolores e leveduras.

Em todas as determinações as contagens aumentaram significativamente durante o período de armazenamento sob refrigeração (7°C) mesmo quando o tempo especificado pelo fabricante era mais reduzido (5 dias).

A capacidade das bactérias, bolores e leveduras para multiplicar a baixas temperaturas em embalagens a vácuo indicou sua habilidade potencial para causar deterioração em produtos minimamente processados, e conseqüentemente risco à saúde pública.

As temperaturas de refrigeração empregadas não são suficientes para inativar o crescimento microbiano quando contagens iniciais elevadas são verificadas.

Não foram comprovadas diferenças entre o crescimento de bactérias mesófilas, psicrotróficas, bolores e leveduras, que indicassem uma maior influência das condições de armazenamento sobre o crescimento.

Embora testes sensoriais ou físico-químicos não tenham sido realizados, as condições de embalagem mostraram-se eficientes para controlar o escurecimento e perda da qualidade visual, mascarando assim qualquer sinal de deterioração microbiana do produto.

A presença de coliformes fecais em 64,7% das amostras indica grande risco da presença de patógenos potencialmente perigosos como *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*

7 Referências bibliográficas

ALMEIDA, C. L. O sistema HACCP como instrumento para garantir a inocuidade dos alimentos. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 12, n. 53, p. 12-20, 1998.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington: M. L. Speck, 1992. 702 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis*. 16. ed. Arlington, 1995.

AYHAN, Z.; CHISM, G. W.; e RICHTER, E. R. The shelf-life of minimally processed fresh cut melons. *Journal of Food Quality*, v.21, n. , p. 29-40, 1998.

BABIC, I. ; WATADA, A. E. Microbial populations of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmospheres. *Postharvest Biology Technology*, v. 9, p. 187-193, 1996.

BARRIGA, M. Let al. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. *Journal of Food Science*, v.56, n.6, p.1586-1588, Nov./Dec.1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12. Disponível em: <file://Anvisa-Legislação-Resolução.htm > Acesso em: 26 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância Sanitária. Portaria N. 451: regulamento técnico de princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, e seus anexos. 19/09/1997. Brasília, 1997.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Salmonellosis, jun. 1998. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/incidod/diseases/foodborn/salmon.htm>> Acesso em: 25 mar. 1999.

CHAPMAN, P. A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections. *British Food Journal*, v.97, n.10, p.29-31,199, Oct. 1995.

CORLETT, D. A. JR. Refrigerated foods and use of hazard analysis and critical control point principles. *Food Technology*, v.43, n.2, p.91-94, Feb. 1989.

D'AOUST, J. Y. et al. Performance assessment of the GENE-TRAK® colorimetric probe assay for the detection of foodborne *Salmonella spp.* *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 10, p. 1069-1076, Oct. 1995

DEL ROSARIO, B. A. ; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichis coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 1, p. 105-107, Jan. 1995.

EIROA, M. N. U. Controle de qualidade microbiológica dos alimentos. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, n.49, p.1-32, jan./fev. 1977.

FLOROS, J. D. The shelflife of fruits and vegetables. In: _____. Shelf lifes studies of foods and beverages: chemical, biological and nutritional aspects. Betsville: Elsevier Science, 1993. p.195-247

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Bacteriological analytical manual*. 7.ed. Washington: 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. U. S. Department of Agriculture Center for Disease Control and Prevention.p. 1-41, Oct. 1998. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov/~dms/>>. Acesso em: 20 jun. 1999.

FOSTER, E. M. The problem of *Salmonellae* in foods. *Food Technology*, v.23, n.9, p.74-78, Sept. 1969.

FREIRE JR., M. Efeito da temperatura de armazenamento e da atmosfera modificada na qualidade do alface hidropônico minimamente processado. 1999. 132 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GAGLIARDI, J. V. ; KARNIS, J. S. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n. 3, p. 877-883, Mar. 2000.

GOLDEN, D. A.; RHODEHAMEL, E. J.; KAUTTER, D. A. Growth of *Salmonella spp* in cantaloupe, watermelon and honeydew melons. *Journal of Food Protection*, v. 56, n. 3, p. 194-196, Mar. 1993.

GORNY, J. R.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A. A. Effects of fruit ripeness and storage temperature on the deterioration rate of fresh-cut peach and nectarine slices. *HortScience*, v.33, n.1, p. 110-113, Feb. 1998.

HANCOCK , D. D.et al. Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in Cattle. *Journal of Food Protection*, v.60, n.4, p.363-366, Apr. 1997.

HO, B. S. W.; TAM, T. -Y. Enumeration of *E. coli* in environmental waters and wastewater using a chromogenic medium. *Water Science Technology*, v.35, n.11-12, p. 409-413, Nov./Dec. 1997.

HOBBS, B. C. Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1999. v. 2, p.145-280.

HOBBS, G. . Ecology of food microorganisms. *Microbial Ecology*, v.12, p. 15-30, 1986.

HOTCHKISS, J. H.; BANCO, M. J. Influence of new packaging technologies on the growth of microorganisms in produce. *Journal of Food protection*, v. 55, n. 10, p.815-820, 1992.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Técnicas de las análisis microbiológicas. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1983. 430 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Ecología microbiana de los alimentos. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1985. v. 2, 1989 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1998. 606 p.

JOHNSON, J. L. et al. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a foodborne disease outbreak. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 6, p. 597-603, June 1995.

KING JR., A. D. et al. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. *Journal Food Science*, v. 56, n. 2, p. 459-461, 1991.

Mac-FADDIN, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2.ed. Baltimore: William & Wilkins, 1980. 586 p.

MADDEN, J. M. Microbial pathogens in fresh produce the regulatory perspective. *Journal of Food Protection*, v.55, n.10, p.821-823, Oct. 1992.

MCINGVALE, S. C. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in butter milk as affected by contamination point and storage temperature. *Journal of Food Protection*, v.63, n.4, p.441-444, Apr. 2000.

MOHD-SOM, F. et al. Microflora changes in modified-atmosphere - packaged broccoli florets stored at refrigerated temperature. *Journal of Food Quality*, v.17, n. , p.347-360, 1994.

NASCIMENTO, M. R.; STAMFORD, T. L. M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. *Higiene Alimentar*, v.14, n.70, p32-35, Mar. 2000.

NGUYEN-THE, C. ; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Food Science and Nutrition*, v.34, n.4, p.371-401, 1994.

PALUMBO, S. A. et al. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, v.58, n.4, p.352-356, Apr. 1995.

PRIEPKE, P. E. ; WEI, L. S. ; NELSON, A. I. Refrigerated storage of prepackaged salad vegetables. *Journal of Food Science*, v.41, n.2, p.379-382, Mar./Apr. 1976.

QUEIROZ, D. M. M. et al. Identification of a new enteroinvasive *Escherichia coli* strain. *Research Microbiology, Paris*, v. 141, n, 6, p.703-706, June 1990.

SCOTT, V. N. Interaction of factors to control microbial spoilage of refrigerated foods. *Journal of Food Protection*, v.52, n.6, p.431-435, June 1989.

SENESI, E.; GALVIS, A., FUMAGALLI, G. Physicochemical and microbiological changes in fresh-cut green bell peppers as affected by packaging and storage. *Italian Journal of Food Science*, v.12, n.1, p.55-64, 2000.

SILVA, N. da ; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SPLITTOESSER, D. F. et al. Coliform content of frozen blanched vegetables packed in the United States. *Journal of Food Safety*, v.2, n.1, p.1-11, July 1980.

SPLITTSTOESSER, D. F. The microbiology of frozen vegetables: how they get contaminated and which organisms predominate. *Food Technology*, v. 27, n. 1, p. 54-60, Jan. 1973.

SPLITTSTOESSER, D. F.; WETTERGREEN, W. P. The significance of coliforms in frozen vegetables. *Food Technology*, v.18, n. 3, p.392-394, 1964.

SUSLOW, T. Microbial food safety is your responsibility! *Vegetable Biotechnology*, p.1-7, Jan. 1999. Disponível em <<http://vric.ucdavis.edu/vrichoml/html/foodsafety/foodsafety.htm>>. Acesso em: 23 abr. 1999.

WILEY, R.C. Frutas y hortalizas minimamente processadas y refrigeradas. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1997. 362p.

ZOTTOLA, E. A. ; SMITH, L. B. The microbiology of foodborne disease outbreaks: na update. *Journal of Food Safety*, v. 11, p. 13-29, 1990.

CAPITULO 3

Indicadores de poluição fecal associados a produtos hortícolas minimamente processados: *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*

1 Resumo

ROSA, Odívia Oliveira. Indicadores de poluição fecal associados a produtos hortícolas minimamente processados: *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*. In:_____. **Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados**. 2002. p.137-162. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A presença de coliformes fecais e patógenos entéricos, como *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella sp.*, em produtos vegetais frescos minimamente processados, é uma preocupação atual. Estes produtos são oferecidos para o consumo imediato, sem sofrerem nenhum processo prévio de cocção. Hortaliças minimamente processadas obtidas de supermercados em Belo Horizonte, MG e Campinas, SP, na data de fabricação, foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia do DCA-UFLA para análise no intuito de detectar a presença de *Escherichia coli* enteropatogênica e *Salmonella sp.* As análises foram conduzidas segundo metodologia descrita no Manual APHA de 1992. Os resultados obtidos indicaram altas contagens de coliformes fecais em 68% das amostras, sendo que 47% foram positivas para *Escherichia coli*. As análises conduzidas para verificar a presença de *Salmonella* mostraram que os produtos almeirão e salada clássica para o preparo de tepanyaki (8%) apresentavam *Salmonella* Carrau. Supõe-se que a contaminação ocorreu durante o manuseio e/ou processamento, por tratarem-se de produtos oriundos da mesma indústria e fabricados na mesma data. Os resultados obtidos evidenciam a contaminação fecal perigosa nas hortaliças e saladas minimamente processadas comercializadas nestes municípios, servindo de alerta para os órgãos fiscalizadores de alimentos.

* Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

2 Abstract

ROSA, Odívia Oliveira; Indicators of pollution fecal associates to products vegetables minimally processed : *Salmonella spp.* and *Escherichia coli*. In: _____. **Microbial flora associated to alterations in fresh-cut vegetables during the commercialization in supermarketers.** 2002. p.137-162. Thesis (Doutorate em Food Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

The presence of faecal coliforms and pathogens enteric as *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella sp.*, in products vegetable fresh minimally processed, it is a current concern once. These products are offered for the immediate consumption without they suffer any previous process of cooking. Minimally processed vegetables obtained of supermarkets in Belo Horizonte, MG and Campinas, SP, in the production date, they were driven to the Laboratory of Microbiology of DCA-UFLA for analysis in the purpose of detecting the presence of *Escherichia coli* enteropathogenic and *Salmonella sp*. The analyses second methodology described in Manual APHA were driven 1992. The obtained results indicated high score of faecal coliforms in 68% of the samples, where 47% were positive for *Escherichia coli*. The analyses driven to verify the presence of *Salmonella* showed that the products almeirão and classic salad for they prepare it of tepanyaki (8%) they presented *Salmonella* Carrau. The supposition of contamination during they handle and/or processing for they be been about products originating from of the same industry and manufactured in the same date. The obtained results evidence the dangerous faecal contamination in the vegetables and salads minimally processed marketed in these municipality districts, serving of alert for the organs inspection of foods.

* Adviser: Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

3 Introdução

Os casos de doenças toxinfeciosas, conhecidas ou suspeitas, envolvendo produtos vegetais frescos são relativamente raros quando comparados àquelas originadas por carnes, aves e leite. A maioria dos casos confirmados envolvendo esses produtos é resultado de práticas inadequadas de higiene e manuseio, nos serviços de alimentação ou na residência dos consumidores.

A implicação do solo na zona de produção, a água de irrigação e os adubos orgânicos usados nas técnicas de melhoramento agrícola são apontados como prováveis fontes de *Salmonella* e *Escherichia coli* O157:H7. Outrossim, pesquisas preliminares mostraram que o esterco animal utilizado para beneficiar o solo, aumentar a fertilidade e a resistência da planta, pode, muitas vezes, ser uma fonte potencial de uma microbiota patogênica, incluindo representantes fecais. Em alguns sistemas agrícolas, o adubo orgânico é utilizado sem tratamento prévio, o que aumenta o risco de contaminação (Gagliardi & Karns, 2000).

Considerando o aumento do consumo de frutos e hortaliças crus, concomitantemente elevou-se o risco de exposição do consumidor às doenças alimentares, pois existem limitadas avaliações e controle de processamento para proteção desses produtos.

As enfermidades alimentares estão emergindo como uma questão universal do impacto da produção, processamento, comercialização interna e exportação, incluindo a confiança do consumidor nos serviços de abastecimento de alimentos e "fast foods".

Barreiras naturais, tais como a pele e a casca, assim como um pH ácido natural, previnem ou retardam o crescimento de bactérias patogênicas nesses

produtos. Contudo, uma vez cortados, os tecidos internos são expostos a contaminantes ambientais e podem servir como substrato para o crescimento de bactérias.

Frutos e hortaliças podem ser contaminados com uma microbiota patógena, no campo ou pomar, durante a colheita, manipulação pós-colheita, transporte, processamento, armazenamento e distribuição. Esses patógenos podem ainda estar presentes no solo, na água de irrigação, nos quais crescem rapidamente quando há presença de matéria orgânica. Beuchat (1996) destaca as principais fontes de microrganismos patógenos em produtos vegetais e as condições que influenciam o crescimento e sobrevivência nestes produtos.

Uma microbiota patógena pode estar presente em produtos minimamente processados e pode alcançar número suficiente para causar doenças, sem alterar as características organolépticas. Em muitos casos esses produtos são consumidos sem sofrerem nenhum processo de cocção. Por isso, a presença de microrganismos patogênicos é de grande interesse neste estudo.

Assim, pretende-se destacar a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* como contaminantes fecais em produtos hortícolas minimamente processados estocados sob refrigeração. Estas informações são essenciais para estabelecer o risco de doenças associadas com o consumo desses produtos, quando contaminados.

4 Materiais e métodos

Um total de 140 amostras de hortaliças e saladas mistas variadas, minimamente processadas, de oito marcas distintas, obtidas nos locais de comercialização nos municípios de Belo Horizonte, MG e Campinas, SP, foram examinadas para identificar a presença de patógenos fecais, como *Escherichia coli* e *Salmonella sp.*

4.1 Identificação de *Escherichia coli*

A detecção e identificação de coliformes fecais e especialmente *E. coli* foram realizadas segundo manual APHA (1992), Bergey's manual (1994), e MacFaddin (1980). Baseou-se em testes presuntivos para determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais em caldo lauryl sulfato triptose e caldo *Escherichia coli* (EC), incubados, respectivamente, a 35°C e 44,5°C durante 24 e 48 horas, seguido de isolamento seletivo diferencial em ágar eosina azul de metileno (EMB-Levine, MERCK). Colônias características foram retiradas do meio e submetidas a testes de coloração de Gram e provas bioquímicas em ágar TSI, ágar LIA, agar três açúcares e ferro (858), agar lisina e ferro (LIA), caldo VMVP, caldo triptona-indol e caldo uréia. As cepas que mostraram resultados positivos para *E. coli* foram submetidas à identificação, utilizando-se kits comerciais API 20E (BioMerieux). Posteriormente, foram enviadas à Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro, para sorotipagem e testes de resistência a antibióticos (Figura 1).

4.2 Pesquisa de *Salmonella spp.*

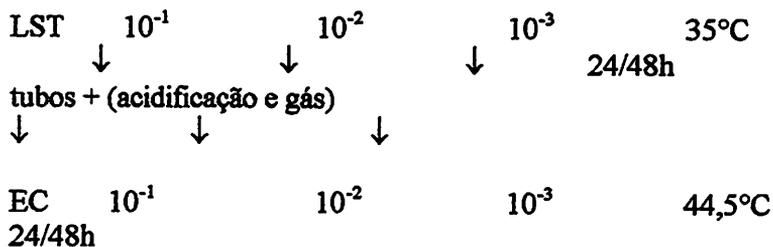
Para detectar a presença de *Salmonella sp.* nas amostras foi utilizada a metodologia recomendada pelo manual APHA (1992), seguindo a sequência de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em placas contendo

meios seletivos diferenciais, purificação e identificação bioquímica. Testes de coloração de Gram e provas bioquímicas em ágar TSI, ágar LIA, citrato e caldo uréia foram realizados para identificação presuntiva das cepas, seguindo-se cultivo em kits comerciais de identificação API 20E (BioMerieux).

As cepas que se mostraram características para *Salmonella sp.* foram encaminhadas ao laboratório do FIOCRUZ para sorotipagem (Figura 2).

Para identificação procedeu-se de acordo com Bergey's manual (1994).

1. Identificação presuntiva



TUBOS POSITIVOS

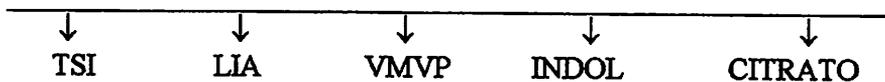
Isolamento em Placas EMB - LEVINE (35°C/24h)

↓

Gram

+

Provas bioquímicas



↓

Identificação kits API 20E

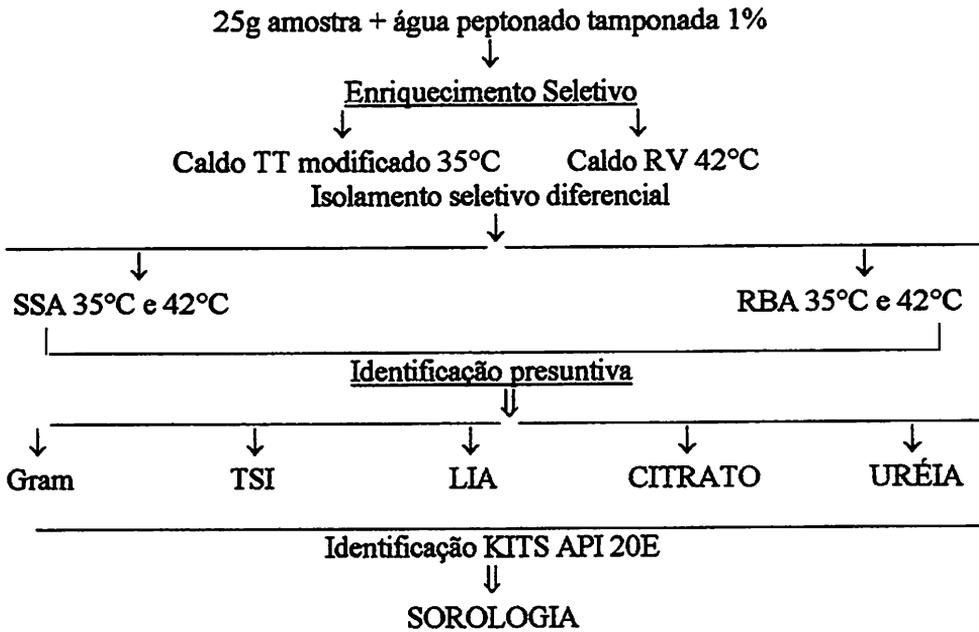
↓

SOROLOGIA

LST	caldo lauril sulfato triptose (DIFCO)
EC	caldo E. coli (DIFCO)
EMB-Levine	ágar eosina azul de metileno segundo Levine (MERCK)
TSI	ágar três açúcares e ferro (DIFCO)
LIA	ágar lisina e ferro (DIFCO)
VMVP	caldo vermelho de metil- Voges Proskauer (MERCK)
INDOL	caldo triptona (DIFCO)
CITRATO	ágar citrato (BIOBRÁS)

FIGURA 1 Esquema de análise para determinação de coliformes fecais e *Escherichia coli*.

2. Pré-enriquecimento



TT	caldo tetrionato (MERCK)
RV	Rappaport-Vasiliadis (MERCK)
SSA	ágar Salmonella/Shigella (MERCK)
RBA	ágar Rambach (MERCK)
TSI	ágar três açúcares e ferro (DIFCO)
LIA	ágar lisina e ferro (DIFCO)
CITRATO	ágar citrato (BIOBRÁS)
URÉIA	caldo uréia (DIFCO)

FIGURA 2 Esquema de análise para detecção de *Salmonella sp.*

5 Resultados e discussões

As contagens obtidas nas análises de hortaliças e saladas minimamente processadas (Figura 3), para coliformes fecais, mostram uma estreita relação com a detecção de *E. coli* nos produtos. A exceção ocorreu nas amostras de broto de alfafa, alface crespa, salsão e salada brisa que, embora apresentando números elevados de coliformes fecais, não isolaram esta bactéria.

De acordo com Levasseur et al. (1992), a contaminação de alimentos por alguns membros do grupo coliformes, particularmente produtos vegetais oferecidos crus para o consumo, como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, ou por espécies de *Salmonella* e *Shigella*, podem ser a causa de severas toxinfecções. Assim, a enumeração destas bactérias, todas pertencentes à família das *Enterobacteriaceae*, é uma das mais importantes análises de controle de qualidade executadas nos laboratórios de rotina microbiológica. Por isso são consideradas como um bom indicador de práticas de higiene e processos de produção inadequados (Splittstoesser & Wettergreen, 1964; Levasseur, et al., 1992; Diaz & Hotchkiss, 1996; Buchanam & Doyle, 1997; FDA, 1998; Suslow, 1999; Bell & Kyriakides, 2000; ANVISA, 2001; FDA, 2001).

De um total de 168 cepas características isoladas em ágar EMB-Levine, 44% foram positivas para *Escherichia coli*; 40,5% para *Klebsiella sp.*; 7,75% para *Citrobacter sp.* e 7,75% para *Pseudomonas sp.*, embora das cepas sorologicamente comprovadas como *E. coli* nenhuma tenha sido positiva para EPEC e EIEC. Cepas resistentes à tetraciclina (TE) e sulfametaxazol-trimetoprim (SXT) foram identificadas (Tabela 1).

Produtos vegetais, como alface, repolho, broto de alfafa, broto de feijão, cenoura, espinafre e frutos, como melões, tomates, melancia, cidra e suco de maçã, foram apontados por vários pesquisadores como veículos de *E. coli* O157:H7 (Zottola & Smith, 1990; Del Rosario & Beuchat, 1995; Diaz &

Hotchkiss, 1996; Seo & Frank, 1999; Hara-Kudo et al., 2000; Takeuchi & Frank, 2000; Gagliardi & Karns, 2000; Bell & Kyriakides, 2000).

Embora a temperatura ótima para crescimento de *E. coli* em caldo EC seja 44,5°C, muitas pesquisas demonstram que EHEC O157:H7 não cresce bem em temperaturas acima de 44°C. Esse fator pode ter dificultado o isolamento destas em nossos estudos, uma vez que os cultivos foram mantidos por 48 horas em temperaturas de 44,5±0,5°C. (Queiroz, 1990; Bettelheim, 1995; Chapman, 1995; Del Rosario & Beuchat, 1995; Dorn, 1995; Johnson et al., 1995; Palumbo, 1995; Diaz & Hotchkiss, 1996; Wallace & Jones, 1996; Buchanan & Doyle, 1997; Bettelheim, 1998; Berry & Cutter, 2000). Por outro lado, os autores indicam que a temperatura mínima para o crescimento dessas cepas é de, aproximadamente, 8° a 10°C e nossas amostras foram armazenadas sob temperatura em torno de 7°C, o que pode ter inibido seu crescimento ou causado injúria celular, dificultando assim o seu isolamento.

Vários autores citam que essa linhagem dificilmente se multiplica ou não se multiplica nas temperaturas geralmente empregadas para pesquisa de *E. coli* em alimento (Palumbo et al., 1995; Nascimento e Stamford, 2000; Takeuchi e Frank, 2000; McIngvale et al., 2000).

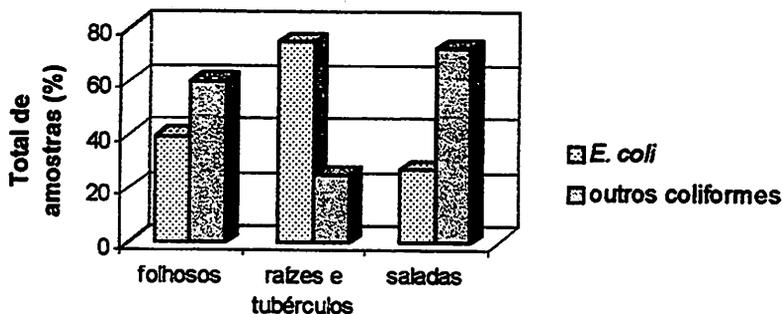


FIGURA 3 Percentual de *Escherichia coli* em produtos hortícolas minimamente processados

Além disso, os autores são unânimes em afirmar que a presença de *E. coli* O157:H7 originalmente está relacionada a produtos animais, particularmente provenientes de ruminantes, enquanto poucos casos estão relacionados a produtos vegetais. Mesmo assim, alguns surtos relatados geralmente foram ocasionados por contaminação cruzada de frutos ou hortaliças com produtos animais contaminados ou ainda decorrentes de irrigação com água poluída com dejetos humanos e animais ou contaminação do solo nos locais de cultivo (Del Rosario & Beuchat, 1995; Diaz & Hotchkiss, 1996; Beuchat, 1996; Hancock et al., 1997; Buchanan & Doyle, 1997; Townsend et al., 1998; Suslow, 1999; Gagliardi & Karns, 2000).

A utilização de caldo EC modificado foi demonstrado por Hara-Kudo et al. (2000) como o mais eficiente para recuperação de células injuriadas de *E. coli* O157:H7. Quando sais biliares e novobiocina foram adicionados, após 2 horas de incubação a 42°C, as células injuriadas pelo frio foram capazes de ressuscitar melhorando a recuperação das cepas.

TABELA 1 Presença de coliformes fecais e *Escherichia coli* em produtos hortícolas minimamente processados (municípios de Belo-Horizonte e Campinas).

Produto	Média de coliformes fecais (NMP/g)	Identificação
Acelga	2	-
Agrião	58	<i>E. coli</i> * TE
Alface crespo	80	-
Alface romano	<3	-
Almeirão	16	<i>E. coli</i> */ <i>Citrobacter sp.</i>
Broto de alfafa	>1275	<i>Klebsiella sp.</i>
Escarola	2	-
Espinafre	56	-
Rúcula	37	<i>E. coli</i> *
Salsão	>2400	<i>Klebsiella sp.</i>
Cenoura em tirinha	>2400	<i>E. coli</i> *
Cenoura fatiada	240	-
Cenoura ralada	>2400	<i>E. coli</i> * SXT
Beterraba fatiada	>2400	<i>E. coli</i> * SXT
Saladas:		
Brisa	>2400	<i>Klebsiella sp.</i>
Clássica	23	<i>Klebsiella sp.</i>
Primavera	16	<i>Klebsiella sp.</i>
Tri-salada	>2400	<i>E. coli</i> *

*Negativo para EPEC e EIEC

Obs: Em cenoura ralada (H) e beterraba fatiada (C), as cepas mostraram resistência antimicrobiana para SXT (sulfametaxozol - trimetoprim) e as cepas do agrião à TE (tetraciclina).

Das marcas analisadas, 25% não apresentaram contaminação fecal comprovada, 62,5% tiveram pelo menos um produto positivo para *Escherichia coli* sp. E, embora uma marca não tenha isolado *E. coli*, apresentou altas contagens de coliformes fecais e cepas identificadas como *Klebsiella sp.* Entretanto, *Klebsiella* é uma bactéria pertencente ao grupo de coliformes fecais, o que não afasta a possibilidade de que cepas *E. coli* presentes nos produtos não puderam ser isoladas devido ao grande número de coliformes presentes.

Algumas evidências demonstraram que coliformes fecais não entéricos

podem originar-se de amostras oriundas de águas tropicais e do solo. Essa característica decorre da sua capacidade de sobrevivência por longo tempo nestes ambientes tornando-se parte da microbiota comum. Dessa forma, a determinação de *Escherichia coli* é largamente aceita para avaliar a poluição fecal em águas e alimentos (Queiroz et al., 1990; Levasseur et al., 1992; Byamukama et al., 2000).

King Jr. et al. (1991) estimaram a frequência de *Pseudomonas sp.* em produtos vegetais MP em 56,7% da população bacteriana. Muitas foram identificadas como *P. fluorescens*. Outras *Pseudomonas*, como *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. cepacia*, *P. paucimobilis* e *P. viridiflava*, foram também menos frequentemente identificadas (Nguyen-the & Carlin, 1994). Os autores informam que a alta proporção de pseudomonas isoladas em de contagens em placas, em amostras de produtos MP, é bastante representativa e, na maioria, elas são pectinolíticas. Estes resultados foram também confirmados em pesquisas por outros autores (Barriga et al., 1991; Babic & Watada, 1996; Bennik et al., 1996; Freire, Jr., 1999).

A identificação de espécies em brotos frescos de feijão e estocados sob atmosfera controlada, foi predominantemente de *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas viridilivida*. Em chicória endívia prevaleceram *Rahnella aquatilis* e algumas espécies de *Pseudomonas* encontradas no produto fresco e, após algum tempo de estocagem sob CA, foram encontradas *Escherichia vulneris* e *Pseudomonas fluorescens* (Bennik et al., 1998). Cantwell (1992) informa que a microbiota normal deteriorante de produtos vegetais inclui as *Pseudomonas*. Esta afirmação é respaldada por outros pesquisadores que afirmam serem estes organismos os mais comuns dentre a microbiota Gram negativa presente em vegetais (Brackett, 1987; Barriga et al., 1991; Brackett, 1992; Babic & Watada, 1996; Bennik et al., 1996).

Das 140 amostras analisadas, 8% foram responsáveis pela presença de *Salmonella*, particularmente as amostras de almeirão e salada clássica para o preparo de tepanyaki (Tabela 2). As amostras implicadas nos testes positivos para *Salmonella* foram oriundas da mesma indústria e produzidas na mesma data. Esse fator leva-nos a supor que uma fonte de contaminação durante o manuseio e/ou processamento foi responsável pela origem da bactéria, podendo estar ligada ao manipulador, utensílios, equipamentos ou superfícies, utilizados no preparo desses produtos.

TABELA 2 Presença de *Salmonella* em produtos hortícolas minimamente processados (Municípios de Belo-Horizonte e Campinas/Brasil).

Produtos	Marcas	Identificação
Acelga	C e H	Ausência
Agrião	B e D	Ausência
Alface crespo	A, B, D	Ausência
Alface romano	D	Ausência
Almeirão	A	Salmonella Carrau
Broto de alfafa	E	Ausência
Escarola	D, G	Ausência
Espinafre	A, G	Ausência
Rúcula	B, C	Ausência
Salsão	A	Ausência
Cenoura em tirinha	C	Ausência
Cenoura fatiada	F	Ausência
Cenoura ralada	H	Ausência
Beterraba fatiada	C	Ausência
Saladas:		
Brisa	A	Ausência
Clássica	A	Salmonella Carrau
Primavera	A	Ausência
Tri-salada	C	Ausência

Por outro lado, é importante salientar que estas amostras apresentaram

baixas contagens de coliformes a 44,5°C. As amostras de almeirão MP fora sorologicamente positivas para *Escherichia coli sp.* e *Citrobacter sp.*, confirmando-se uma contaminação fecal perigosa.

Foram selecionadas um total de 78 cepas características, isoladas em ágar Rambach/42°C e identificadas bioquimicamente em kits comerciais API 20E (BioMerieux). De 23,08% das cepas que mostraram resultados positivos para *Salmonella sp.*, 3,38% foram posteriormente identificadas sorologicamente como *Salmonella enterica* Carrau, correspondendo a 8% do total das amostras analisadas (Figura 4).

Investigações de produtos frescos têm revelado a presença de alguns sorotipos de *Salmonella* capazes de causar infecção humana em produtos vegetais frescos (Foster, 1969; Piccolo et al., 1992; Sammarco et al., 1997; Shapiro et al., 1999; FDA, 2001). Beuchat (1996) cita amostras de vegetais como berinjela, couve-flor, pimenta, escarola, alface, agrião, mostarda, broto de feijão, tomates e outras hortaliças, além de frutos, como responsáveis pela veiculação de *Salmonella* em muitos países. Entre os sorotipos encontrados destaca-se *S. Schotkmuelli*, *S. Typhimurium*, *S. Thompson*, *S. Dublin*, *S. Typhi*, *S. Anatum*, *S. Javiana*, *S. Mmontevideo*, *S. Havana* e *S. Mmuenchem*, entre outros, como causa de contaminação em fazendas horticolas ou durante o manuseio, o processamento, o preparo e a distribuição de vegetais frescos e saladas cruas.

Dois surtos de salmonelose envolvendo tomates crus foram reportados, um em 1992 e o outro em 1993 (Beuchat, 1996). Pesquisas realizadas por Zhuang et al. (1995), utilizando *S. Montevideo* isoladas de pacientes infectados revelaram que o patógeno pode crescer na superfície de tomates e em tomates cortados e estocados a 20°C ou 30°C, por 96 e 22 horas, respectivamente.

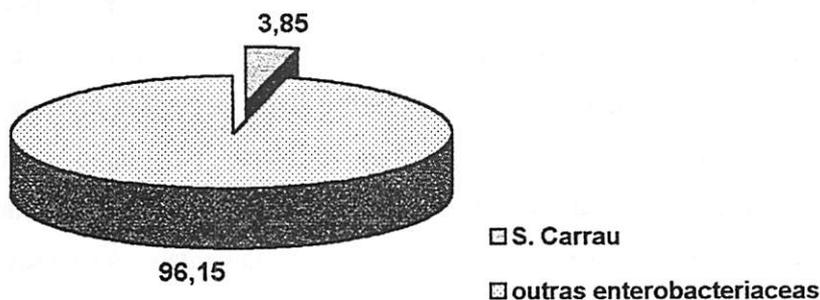


FIGURA 4 Detecção de *Salmonella* entérica Carrau em hortaliças e saladas mistas minimamente processadas

A presença de *Salmonella* foi também associada ao consumo de melões cantaloupe nos Estados Unidos. A contaminação do interior dos melões ocorreu após contato com a casca não lavada, durante e após o fracionamento destes (Madden, 1992). Estudos conduzidos por Golden et al. (1993) para verificar a habilidade de *Salmonella sp.* crescer no tecido de melões, indicaram que seu crescimento foi rápido a 23°C de incubação. Estes resultados determinaram a prevalência de *Salmonella* nestes produtos, levando o FDA a estabelecer critérios de riscos. As recomendações feitas para estabelecimentos varejistas, neste caso, indicavam que estes deveriam submeter os melões a lavagens em soluções sanificantes, além da desinfecção de utensílios e superfícies utilizados no preparo dos melões.

As recomendações quanto ao tempo e temperatura para manuseio foram também indicadas. Os melões cortados deveriam ser conservados abaixo de 7°C e não seriam expostos por mais de 4 horas se não estivessem sob refrigeração (FDA, 1998).

De acordo com o Center for Disease Control and Preservation (CDC, 1998), salmoneloses humanas atribuídas ao consumo de frutos e hortaliças nos

Estados Unidos ocorreram somente em 2,2% de todos os casos informados no período de 1983-1987. Surtos ocasionados pelo consumo de melancias pré-cortadas e embaladas, contaminadas com *S. Miami*, *S. Bareilly* e *S. Oraniemburg* foram reportados por Goldem et al. (1993). Estas pesquisas indicaram que a manutenção das frutas em temperatura ambiente por longo período, foi, provavelmente, a causa da multiplicação do agente. Estes dados indicam a necessidade de intervenção de órgãos governamentais responsáveis pela segurança dos produtos vegetais comercializados no país em indústrias e locais de produção e distribuição de produtos hortifrutigranjeiros, evitando assim não só o risco de enfermidade para o consumidor, como também sérias conseqüências econômicas.

A presença de enterobacteriáceas em produtos vegetais frescos está relacionada ao descuido e descaso durante o plantio, coleta, manuseio, transporte, distribuição, pré-preparo e preparo. A utilização de águas poluídas para irrigação, juntamente com o uso de adubos orgânicos sem qualquer segurança sanitária, agrava o perigo potencial da presença de patógenos entéricos tóxicos nestes produtos.

As altas contagens de coliformes fecais obtidas nas análises refletem a necessidade de um maior controle na higienização desses vegetais que estão sendo oferecidos para o consumo cru. O fato é agravante quando cepas sorologicamente determinadas como *Escherichia coli* e *Salmonella* Carrau foram identificadas.

As análises de hortaliças frescas e saladas MP comercializadas no varejo são citadas com freqüência como passivas de contaminação por *Escherichia coli* e *Salmonella*, (Beuchat, 1996). Porém, a presença de *E. coli* O157:H7 nas análises laboratoriais de rotina é considerada rara por Bell & Kyriakides (2000), devido às técnicas e temperaturas utilizadas. Urge, portanto, que técnicas mais aprimoradas e eficazes sejam praticadas na avaliação do produto final, a fim de

reduzir ao mínimo a oportunidade de que produtos contaminados cheguem à mesa do consumidor.

6 Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam a contaminação fecal perigosa nas hortaliças e saladas mistas minimamente processadas, comercializadas nos municípios de Belo Horizonte, MG e Campinas, SP. Eles sugerem a possibilidade de ocorrência de outros patógenos entéricos nos produtos e, conseqüentemente, o risco de surtos de toxinfecção alimentar.

Nossos resultados mostraram cepas de *Escherichia coli* resistentes a substâncias antimicrobianas, como a tetraciclina e sulfametaxazol-trimetoprim, presentes nos produtos.

Do total de 8% das amostras analisadas que se mostraram suspeitas da presença de salmonela, 3,85% das cepas isoladas para identificação bioquímica e sorotipagem foram identificadas como *Salmonella* entérica Carrau

A identificação de *Salmonella* Carrau determina a prevalência deste agente nestes produtos, conduzindo à necessidade de implantação de programas de controle de qualidade e detecção de pontos críticos de contaminação durante o processamento e distribuição.

7 Referências bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 1992.

BABIC, I. ; WATADA, A. E. Microbial populayion of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmospheres. **Postharvest Biology and Technology**, v.9, n. , p.187-193, 1996.

BARRIGA, M. I. et al. Microbial changes in shredded iceberg lettuce stored under controlled atmospheres. **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1586-1588, Nov./Dec. 1991.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *E. coli*: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Zaragoza-Espanha: Acribia, 2000. 234 p.

BENNIK, M. H. J. et al. Microbiology of minimally processed, modified-atmosphere packaged chicory endive. **Postharvest Biology and Technology**, v.9, n.2, p.209-221, 1996.

BENNIK, M. H. J. et al. The influence of oxygen and carbon dioxide on the growth of prevalent *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* species isolated from fresh and controlled-atmosphere-stored vegetables. **Food Microbiology**, v.15, n.4, p.459-469, 1998.

BERGEY'S MANUAL® OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. **Bacteriological analytical manual**. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 1687p.

BERRY, E. D. ; CUTTER, C. N. Efects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.4, p.1493-1498, Apr. 2000.

BETTELHEIM, K.A. Identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* by means of their production of enterohaemolysin. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, n. 1, p.178-180, 1995.

BETTELHEIM, K.A. Reliability of CHROMagar®O157 for the detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 but not EHEC belonging to other serogroups. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, n. 4, p.425-428, 1998.

BEUCHAT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, v.59, n.2, p.204-216, Feb. 1996.

BRACKETT, R. E. Microbiological consequences of minimally processed fruit and vegetables. **Journal of Food Quality**, v.10, n.6, p.195-206, June 1987.

BRACKETT, R. E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, v.55, n.10, p.808-814, Oct. 1992.

BRASIL Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Resolução RDC n. 12**. Disponível em: <file://Anvisa-Legislação-Resolução.htm>. Acesso em: 26 jan. 2001.

BUCHANAN, R. L. ; DOYLE, M. P. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E.coli*. **Food Technology**, v.51, n.10, p.69-76, Oct. 1997.

BYAMUKAMA, D. et al. Determination of *Escherichia coli* contamination with chromocult coliform agar showed a high level of discrimination efficiency for differing fecal pollution levels in tropical waters of Kampala, Uganda. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.2, p.864-868, Feb. 2000.

CANTWELL, M. Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables. In: KADER, A. A. **Postharvest technology of horticultural crops**. 2. ed. California: University of Division of Agriculture and Natural Resources, 1992. Cap. 32, p.277-281.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonellosis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/incidod/diseases/foodborn/salmon.htm>>. jun. 1988. Acesso em 25 mar. 1999.

CHAPMAN, P. A. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections. **British Food Journal**, v.97, n.10, p.29-31, 199, Oct. 1995.

DEL ROSARIO, B. A. ; BEUCHAT, L. R. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 1, p. 105-107, Jan. 1995.

DIAZ, C.; HOTCHKISS, J. H. Comparative growth of *Escherichia coli* O157:H7, spoilage organisms and shelf-life of shredded iceberg lettuce stored under modified atmospheres. **Journal Science Food Agriculture**, v. 70, n.4, p.433-438, 1996.

DORN, C. R. *Escherichia coli* O157:H7. **Javma**, v.206, n.10, p1583-1585, May 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables**. U. S. Department of Agriculture Center for Disease Control and Prevention. 1998. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov/~dms/>>. Acesso em: 20 jun. 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Potencial for infiltration, survival and growth of human pathogens within fruits and vegetables**. 1999. Disponível em: <<http://www.cfsn.fda.gov/~comm/juicback.html/>> Acesso em: 28 ago. 2001.

FOSTER, E.M. The problem of *Salmonellae* in foods. **Food Technology**, v.23, n.9, p.74-78, Sept. 1969.

FREIRE JR., M. Efeito da temperatura de armazenamento e da atmosfera modificada na qualidade do alface hidropônico minimamente processado. 1999. 132p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras..

GAGLIARDI, J. V. ; KARNS, J.S. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.3, p. 877-883, Mar. 2000.

GOLDEN, D. A.; RHODEHAMEL, E. J.; KAUTTER, D. A. Growth of *Salmonella spp.* in cantaloupe, watermelon and honeydew melons. **Journal of Food Protection**, v. 56, n.3, p.194-196, Mar. 1993.

HANCOCK, D. D. et al. Effects of farm manure-handling practices on *Escherichia coli* O157 prevalence in Cattle. **Journal of Food Protection**, v.60, n.4, p.363-366, Apr. 1997.

HARA-KUDO, Y. et al. Selective enrichment with a resuscitation step for isolation of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.7, p.2866-2872, July 2000.

JOHNSON, J. L. et al. Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak. **Journal of Food Protection**, v.58, n.6, p.597-603, June 1995.

KING JR., A. D. et al. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. **Journal of Food Science**, v. 56, n.2, p.459-461, 1991.

LEVASSEUR, S. et al. Rapid detection of members of the family *Enterobacteriaceae* by a monoclonal antibody. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.5, p.1524-1529, May 1992.

MAC-FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2.ed. Baltimore: William & Wilkins, 1980.

MADDEN, J. M. Microbial pathogens in fresh produce the regulatory perspective. **Journal of Food Protection**, v.55, n.10, p.821-823, Oct. 1992.

MCINGVALE, S. C. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in butter milk as affected by contamination point and storage temperature. **Journal of Food Protection**, v.63, n.4, p.441-444, Apr. 2000.

NASCIMENTO, M. R.; STAMFORD, T. L. M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.14, n.70, p32-35, Mar. 2000.

NGUYEN-THE, C. ; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Food Science and Nutrition**, v.34, n.4, p.371-401, 1994.

PALUMBO, S. A. et al. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v.58, n.4, p.352-356, Apr. 1995.

PICCOLO, R. C. et al. Surto de salmonelose ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo, em 1991. **Higiene Alimentar**, v.6, n.23, p.28-30, set. 1992.

QUEIROZ, D. M. M. et al. Identification of a new enteroinvasive *Escherichia coli* strain. **Research Microbiology**, Paris, v. 141, n. 6, p.703-706, Jan. 1990.

SAMMARCO, M. L. et al. Prevalence of *Salmonellae*, *Listeriae*, and *Yersiniae* in the slaughterhouse environment and on work surfaces, equipment, and workers. **Journal of Food Protection**, v.60, n.4, p.367-371, Apr. 1997.

SEO, K. H. ; FRANK, J. F. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to lettuce leaf surface and bacterial viability in response to chlorine treatment as demonstrated by using confocal scanning laser microscopy. **Journal of Food Protection**, v.62, n.1, p.3-9, Jan. 1999.

SHAPIRO, R. et al. *Salmonella Thompson* associated with improper handling of roast beef at a restaurant in Sioux Falls, South Dakota. **Journal of Food Protection**, v.62, n.2, p.118-122, Feb. 1999.

SPLITTSTOESSER, D. F.; WETTERGREEN, W. P. The significance of coliforms in frozen vegetables. **Food Technology**, v.18, n. , p.392-394, 1964.

SUSLOW, T. Microbial food safety is your responsibility! **Vegetable Biotechnology**, p. 1-7, Jan. 1999. Disponível em: <<http://vric.ucdavis.edu/vrichoml/html/foodsafety/foodsafety.htm>>. Acesso em: 03 abr. 1999.

TAKEUCHI, K. ; FRANK, J.F. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability. **Journal of Food Protection**, v. 63, n.4, p.434-440, Apr. 2000.

TOWNSEND, D. E.; IRVING, R.L. ; NAQUI, A. Comparison of the simplate coliform and *Escherichia coli* test with petrifilm, three-tube MPN, and VRBA-MUG methods for enumerating coliform and E.coli in foods. **Journal of Food Protection**, v.61, n.4, p.444-449, Apr. 1998.

WALLACE, J. S. ; JONES, K. The use of selective and differential agars in the isolation of *Escherichia coli* O157 from dairy herds. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, n.4, p.663-668, 1996.

ZHUANG, R. Y.; BEUCHAT, L. R. ; ANGULO, F. J. Fate of *Salmonella Montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature e treatment with chlorine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.2127-2131, 1995.

ZOTTOLA, E. A. ; SMITH, L. B. The microbiology of foodborne disease outbreaks: na update. **Journal of Food Safety**, v. 11, n.8, p. 13-29, Aug. 1990.

CAPÍTULO 4

Ocorrência de patógenos toxígenos em produtos hortícolas minimamente processados: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*.

1 Resumo

ROSA, Odívia Oliveira. Ocorrência de patógenos toxígenos em produtos hortícolas minimamente processados: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*. In: _____. **Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados**. 2002. p.163-202 Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Vegetais minimamente processados são submetidos à intensa manipulação, envolvendo corte, descasque, fracionamento, etc. Tais ações alteram o comportamento dos tecidos, viabilizando a introdução de uma microbiota que normalmente não estaria presente. Uma vez que a remoção de sujidades aderidas, assim como a sanificação, é realizada pelo uso de água, a procedência e qualidade desta é fator preponderante na contaminação desses produtos. As mudanças nas condições ambientais, como elevado pH, baixo conteúdo de sal, umidade relativa alta, baixas condições de oxigênio, juntamente com altas temperaturas de armazenamento (>5°C) aumentam o risco de multiplicação de bactérias patogênicas e deteriorantes. Objetivando avaliar os perigos e riscos decorrentes da presença de microrganismos toxígenos, como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, em produtos minimamente processados (MP), 140 amostras de hortaliças MP comercializadas em redes de supermercados de Belo Horizonte, MG e Campinas, SP; foram analisadas. A metodologia utilizada foi a citada no "American Public Health Association" APHA/1992, "Food and Drug Administration" FDA/1995 e Association of Official Analytical Chemists AOAC/1990. A incidência de *B. cereus* foi verificada em 33,33% das amostras, apresentando médias de contagens entre $4,6 \times 10^2$ à $6,6 \times 10^5$ UFCg⁻¹, tendo 4,28% apresentado índices >10⁵ UFCg⁻¹, indicando riscos de produção de toxina. Após o armazenamento sob refrigeração estes índices foram reduzidos <10² UFC g⁻¹ para *B. cereus*, com exceção de almeirão fatiado, marca A, que teve as médias de contagens iniciais aumentadas em 2 ciclos log₁₀. As contagens iniciais de *Staphylococcus coagulase* positivos foram >10³ UFCg⁻¹, alcançando índices finais de até $8,35 \times 10^6$ UFCg⁻¹. Destas, 1% foi positiva para enterotoxina estafilocócica B (SEB) e 1,98% apresentou toxinas inespecíficas. Embora não tenham sido identificadas *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas, 12,21% das cepas biomorfológicamente características foram positivas para *Listeria innocua* sorovar 6a e 16,28% para *Listeria innocua* não tipável. Os

* Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

produtos analisados oferecem, portanto, risco potencial de toxinfecção alimentar.

2 Abstract

ROSA, Odívia Oliveira. Pathogens foodborne in fresh-cut vegetables: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. In: _____. **Microbial flora associates to alterations in fresh-cut vegetables during the commercialization in supermarkets.** 2002.p.163-202. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Fresh-cut vegetables are submitted the intense manipulation involving court, shell, shredded, etc., that alter the behavior of the fabrics making possible the introduction of microorganisms that would not be usually present. Once the filthiness removal stuck as well as the sanitation is accomplished by the use of water, the origin and quality of this it is preponderant factor in the contamination of those products. The changes in the environmental conditions as high pH, low content of salt, humidity relative high, low conditions of oxygen, together with high storage temperatures (>5°C) they increase the risk of multiplication of spoilage and pathogens bacterias. Objectifying to evaluate the dangers and current risks of the presence of microorganisms poisonous as *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in products minimally processed (MP), 140 samples of vegetables MP marketed in nets of supermarkets of Belo Horizonte - MG and Campinas - SP / BRAZIL. They were analyzed according to methodology mentioned in " American Public Health Association " APHA/1992, " Food and Drug Administration " FDA/1995 and Association of Official Analytical Chemists AOAC/1990. The incidence of *B. cereus* was of 33,33% of the samples, presenting counts averages among $4,6 \times 10^2$ to $6,6 \times 10^5$ UFC g⁻¹, where 4,28% presented indexes > 10^5 UFCg⁻¹, indicating risks of toxin production After the storage under refrigeration these indexes was reduced < 10^2 UFC g⁻¹ for *B. cereus*, except for almeiron shredded, marks A, that had the averages of initial counts increased in 2 cycles log₁₀. The initial counts of *Staphylococcus* positive-coagulase was > 10^3 UFCg⁻¹, reaching final indexes of up to $8,35 \times 10^6$ UFCg⁻¹, of these 1% they were positive for enterotoxin Sthaphylococcae B (SEB) and 1,98% presented toxins don't specific. Although *Listeria monocytogenes* has not been identified in the analyzed samples, 12.21% of the stumps biomorphological characteristic were positive for *Listeria innocua* sorovar 6a and 16.28% *Listeria innocua* sp. The analyzed products offer, therefore, I scratch out potential of alimentary poisoning.

* Adviser: Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA

3 Introdução

Inúmeros estudos mostram que bactérias de grande significado em saúde pública podem ocorrer em vegetais, devido à contaminação durante a produção, colheita, transporte, processamento, distribuição e comercialização de produtos vegetais. Estas pesquisas revelam a presença de bactérias toxígenas como *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus* e *Vibrio parahaemolyticus*.

O risco no consumo de alimentos de conveniência, devido a recentes surtos de enfermidades, às vezes causados por bactérias que podem crescer à 5°C, como é o caso da *Listeria monocytogenes* e *Aeromonas hydrophila*. Outros grupos de bactérias patogênicas, que podem crescer a temperaturas de refrigeração superiores a 5°C, que incluem o *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio parahaemolyticus*.

Patógenos potencialmente toxígenos foram detectados em várias amostras de vegetais MP. *Listeria monocytogenes* foi detectada em 3 a 19% das amostras analisadas e *Yersinia enterocolitica* em mais de 76% das amostras. *Aeromonas hydrophila* foi também detectada, embora seu significado como patógeno humano seja objeto de debate entre os pesquisadores (Nguyen-the & Carlin, 1994; Bennik et al., 1996; Beuchatt, 1996B; Baek et al., 2000).

Um resumo sobre a origem de patógenos conhecidos, presentes em produtos frescos implicados em surtos de gastroenterites humanas e as condições que influenciam no seu crescimento e sobrevivência foi apresentado por Beuchatt (1996a). O autor destaca principalmente os fatores de contaminação durante a produção e manuseio destes produtos pela exposição a patógenos provenientes da água de irrigação, fertilizantes orgânicos, manipuladores infectados e linha de

processamento contaminada.

O aumento da superfície de exposição de frutos e hortaliças MP, devido ao fracionamento, a disponibilidade de nutrientes, juntamente com o aumento na manipulação dos produtos, provê maior oportunidade para contaminação por meio de organismos patogênicos. Ocasionalmente, patógenos podem ocorrer também, devido ao uso de água de irrigação contaminada ou fertilizantes orgânicos utilizados durante o cultivo ou, ainda, como consequência de higiene insuficiente durante o processamento.

O crescimento de microrganismos psicrotróficos durante o período normal de estocagem de hortaliças MP é citado como uma das causas mais freqüentes de deterioração destes produtos, além de oferecer risco da presença de representantes patogênicos importantes. Os organismos psicrotróficos usualmente responsáveis por esta deterioração são bactérias Gram negativas, particularmente *Erwinia* e *Pseudomonas*.

Muitos estudos foram conduzidos objetivando verificar as condições de embalagem e armazenamento favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, assim como as condições que oferecem segurança para comercialização e ampliação da vida útil desses produtos. Trabalhos apresentados por Beuchat & Brackett (1990) reportam que, o crescimento de microrganismos psicrotróficos não foi reduzido pelas condições de atmosfera modificada nas embalagens de alface contendo 3% de O₂ com ou sem 5% de CO₂. Entretanto, em pesquisas realizadas pelos autores com alface fatiada embalada sob 3% de O₂ e 10% de CO₂, os números de psicrotróficos mantiveram-se significativamente baixos e a qualidade comercial do produto manteve-se aceitável.

Dados indicam que *Listeria monocytogenes* é freqüente em hortaliças MP e usualmente estão presentes em pequeno número, sendo isolada somente após enriquecimento. Por outro lado, o grupo de trabalho em listeriose da

Organização Mundial de Saúde (OMS), destaca o papel dos fertilizantes orgânicos na transmissão deste agente. Outrossim, estudos apresentados por Nguyen-the & Carlin (1994) e Beuchat (1996a) mostram que o crescimento de *Listeria monocytogenes*, inoculada em chicória MP, não foi inibido pelo empacotamento sob atmosfera modificada submetida subseqüentemente a estocagem sob refrigeração. Estes resultados são também confirmados pelos estudos realizados por Berrang et al. (1990) que afirmam que, embora os aspargos mantivessem a qualidade sensorial aceitável, *Listeria monocytogenes* continuou crescendo.

A atenção sobre o risco de aumentar o número de bactérias patogênicas aumentar em produtos embalados com filme plástico, devido à umidade relativa alta baixa condições de oxigênio, baixo conteúdo de sal, alto pH celular e temperatura de armazenamento $>5^{\circ}\text{C}$, praticadas na obtenção dos produtos MP, ganham destaque nos trabalhos realizados na última década.

Staphylococcus aureus foi detectado em produtos vegetais frescos e saladas preparadas, decorrente de manuseio inadequado, embora não seja um bom competidor com outros organismos normalmente presentes em produtos vegetais frescos. Sua presença, além de estar associada a uma manipulação intensa e perigosa, presença de portadores assintomáticos na linha de processamento e embalagem, está associada também à mistura de ingredientes contaminados, particularmente de origem animal.

Inúmeros surtos de enfermidades alimentares atribuídos ao *Bacillus cereus* foram também associados ao consumo de grãos e cereais contaminados com o agente, particularmente com arroz pré-cozido. Entretanto, desde o início do século passado, o *Bacillus cereus* vem sendo relacionado com casos de toxinfecções alimentares envolvendo produtos cárneos, sopas desidratadas, massas alimentícias, doces e produtos vegetais. Goepfert et al. (1972) revelaram que, do total de surtos causados por *Bacillus cereus* na Hungria, no período de

1960 a 1968, 10,6% envolviam produtos vegetais.

A proposta deste trabalho foi detectar a presença de patógenos toxígenos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* em produtos hortícolas minimamente processados, e discutir as causas potenciais da presença destes, alertando para o risco de veiculação de enfermidades associadas ao consumo de produtos contaminados.

4 Materiais e Métodos

Cento e quarenta amostras de hortaliças e saladas mistas minimamente processadas (acelga, agrião, alface crespo e romano, almeirão, espinafre, escarola, salsão, rúcula, broto de alfafa, cenoura, beterraba), de várias marcas, embaladas sob condições de atmosfera modificada ativa ou passiva, mantidos sob refrigeração, foram obtidas em redes de supermercados de Belo Horizonte, MG e Campinas, SP, da mesma maneira como são adquiridas pelo consumidor. Essas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA, UFLA e analisadas no dia de fabricação e ao final do período de validade estabelecida na embalagem. As amostras foram mantidas sob refrigeração ($7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$), conforme indicação do fabricante.

Após realizar as diluições decimais necessárias, procederam-se às análises para detecção de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, conforme normas citadas no "American Public Health Association - APHA" (1992), Bacteriological Analytical Manual - FDA (1995) e Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1992). Para identificação bioquímica e sorológica, foram utilizados também Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1994) e Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria (MacFaddin, 1980).

Para estabelecer as condições higiênico-sanitárias de fabricação dos produtos, os resultados foram comparados aos padrões microbiológicos para alimentos estabelecidos na Portaria n° 451/1997 do SVS-MS/Brasil, RDC n°12/2001, ANVISA/Brasil e especificações e recomendações internacionais (Brasil, 1997; 2001).

4.1 Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

Foram selecionadas placas inoculadas em Agar Baird-Parker (BPA-MERCK), incubadas a $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 e 48 horas, que apresentaram limites de contagens entre 20-200 colônias típicas e atípicas para estafilococos. Estas cepas foram isoladas, purificadas e confirmadas por meio de testes bioquímicos de oxidase, catalase, coagulase, coloração de Gram e fermentação aeróbica e anaeróbica de açúcares. As cepas que se mostraram como cocos Gram positivas, catalase e coagulase positivas foram separadas, purificadas e enviadas ao Laboratório de Patógenos da FUNED-BH para realização de teste de termonuclease e detecção de enterotoxina (Figura 1).

Preparo e diluição de amostras

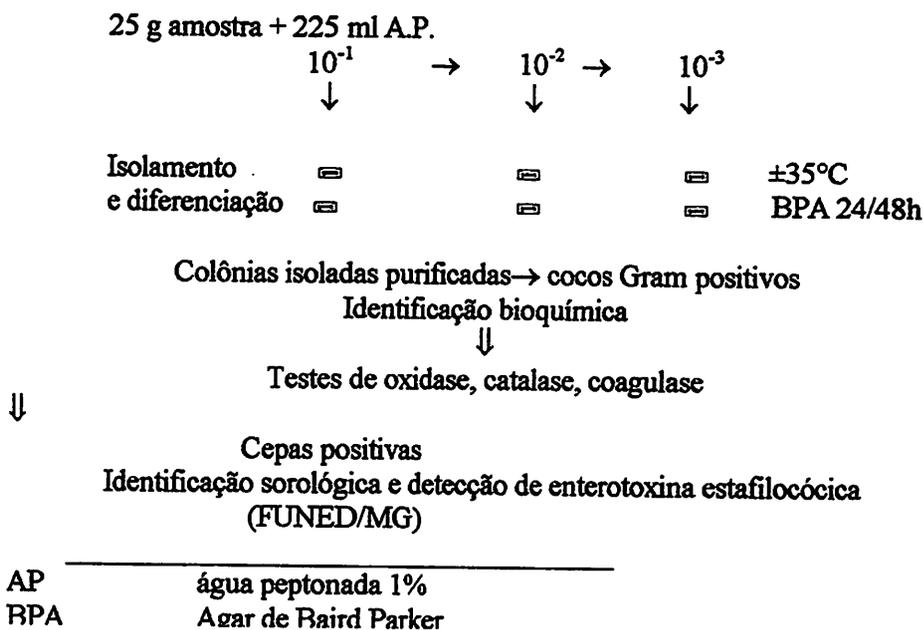


FIGURA 1 Esquema de análise para *Staphylococcus aureus*

4.3 Presença de *Listeria monocytogenes*

Para detectar a presença de *Listeria monocytogenes*, as amostras de hortaliças MP foram submetidas à análise microbiológica, segundo o Método do FDA (1995; 2001) seguindo o esquema apresentado por Silva et al. (1997). Foram homogeneizadas 25g das amostras, em 225 ml de caldo enriquecimento de listeria (LEB-MERCK) e incubadas por 4h/30°C. Foram então adicionados os agentes seletivos, seguindo-se à incubação a 30°C/24h, 48horas e sete dias. Após cada um destes períodos de incubação, foi realizado plaqueamento seletivo diferencial, utilizando placas de ágar Oxford (OXA-MERCK) e placas de ágar PALCAN (OXOID) e incubadas a 35°C/24 e 48horas.

Após observar a presença de colônias típicas, estas foram selecionadas de cada meio para purificação e confirmação em placas de ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE) e incubadas à 30°C/24 e 48horas. Observadas as colônias sob luz oblíqua, foram selecionadas as azuladas típicas, bem isoladas, para realizar as provas de confirmação bioquímica. Foram identificadas biomorfológicamente por meio de testes de coloração de Gram, teste de catalase, teste de motilidade, nitrato, TSI, testes de verificação de hemólise, fermentação da dextrose, xilose, rhamnose, manitol, maltose e esculina.

Todas as cepas que mostraram-se como cocobacilos ou bastonetes curtos, Gram positivas, móveis com crescimento característico a 25° e 35°C, lembrando um guarda-chuva, catalase positiva, nitrato negativa, TSI característico, hemolíticas, não fermentadoras de xilose e manitol, e fermentadoras de ramnose, dextrose, maltose e esculina, foram consideradas suspeitas de serem *Listeria sp.* Foram então submetidas a testes de identificação em kits do sistema API-Listeria (BioMerieux), para confirmação e, posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do FIOCRUZ, para identificação sorológica (Figura 3).

Enriquecimento e plaqueamento diferencial

225 ml + 25 g

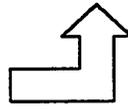
LEB amostra ⇒

Incubar 30°C/4h

Adicionar agentes seletivos



Reincubar
por mais 24h e repetir
plaqueamento com 48h
e com sete dias



Placas de OXA e placas de PALCAM
plaqueamento por estrias

Incubar { OXA 35°C/ 24 e 48h

{ PALCAM 30°C/ 24 e 48h

observar a presença de colônias
típicas e, em caso negativo
reincubar e observar após 48h



Confirmação das colônias:

selecionar pelo menos cinco
colônias típicas de cada placa.

Estriar cada colônia em TSA-YE 30°C/24-48h



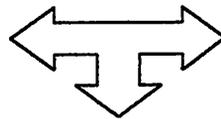
Observar sob luz oblíqua e selecionar
colônias azuladas típicas



Transferir a colônia para tubo de TSB-YE
Incubar a 30°C/24h

Identificação bioquímica

TSA-YE
(catalase, hemólise)



TSB-YE
(motilidade, nitrato, TSI)

API

Sistema de identificação de *Listeria*



Identificação sorológica
(FIOCRUZ)

LEB	caldo de enriquecimento para <i>Listeria</i>
OXA	ágar Oxford
TSA-YE	ágar Trypticase de Soja suplementado com extrato de levedura
TSB-YE	caldo Trypticase de soja suplementado com extrato de levedura

FIGURA 3 Esquema de análise para *Listeria Monocytogenes* (Método FDA, 8ª ed. 1995)

5 Resultados e Discussões

5.1 *Staphylococcus aureus*

Foram isoladas, a partir dos cultivos em ágar de Baird Parker (BPA), 182 cepas suspeitas de serem estafilococos para identificação bioquímica. Destas, 101 (55,5%) eram cocos Gram positivos, 74 (40,7%) catalase positivas, e apenas 41 (22,5%) foram positivas para Gram, catalase e coagulase.

As contagens iniciais de colônias em placas de BPA incubadas por 48h à $35\pm 1^\circ\text{C}$ apresentaram-se $>10^3$ UFCg⁻¹, chegando até a $8,35 \times 10^6$ UFCg⁻¹. A exceção ocorreu com as amostras de acelga, agrião, espinafre, alface romana, alface crespa e escarola, que tiveram suas contagens iniciais e finais < 10 UFCg⁻¹ (Tabela 1).

É importante esclarecer que todos os produtos analisados apresentaram contagens iniciais bastante elevadas de colônias típicas de estafilococos no ágar Baird Parker, embora algumas cepas isoladas para testes de identificação não tenham confirmado a presença de estafilococos coagulase positivos. Outrossim, algumas cepas que se apresentaram com halos opacos e zonas de transparência (halo de lecitinase) apresentaram-se como bacilos esporulados Gram positivos.

As provas mais freqüentes para diferenciar as espécies de estafilococos patogênicos são as de coagulase e termonuclease. O método clássico para diferenciação de *S. aureus*, utilizando primariamente o teste de coagulase é recomendado por vários autores (Sperber & Tatini, 1975; APHA, 1992; Chang & Huang, 1995; Su & Wong, 1997; ICMSF, 1998; Gay & Fox, 2001).

O ICMSF (1998) recomenda outros dispositivos, como o sistema API Staph-Ident, para determinar os estafilococos produtores de coagulase.

Segundo Hurst (1995), uma das fontes potenciais de transmissão de patógenos bacterianos transferidos para produtos minimamente processados, especialmente estafilococos, são os manipuladores que fisicamente executam as

operações durante o preparo e produção destes produtos. Schlimme (1995) atribui também a presença deste agente ao manuseio intenso a que os produtos estão submetidos além da falta de conhecimentos higiênicos por parte dos manipuladores. Muitas vezes, esta contaminação é agravada pela manutenção do alimento à temperatura ambiente por longo período durante a comercialização. Estudos realizados por Iaria et al. (1980) mostram que 35,5% dos manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares eram portadores de *S. aureus* e, destes, 16,7% foram positivos para enterotoxina tipo C (SEC). Outros estudos também confirmam o perigo de contaminação durante o manuseio do produto, uma vez que esta bactéria tem sido isolada da região nasal, mãos e da orofaringe de manipuladores em diversos estabelecimentos e áreas de produção industrial (Bauman, 1974; Bolin et al, 1977; Iaria, 1980; 1981; Castro & Iaria 1984; Bolin & Huxsoll, 1989; Corlett Jr., 1989; Eiroa, 1989; Brackett, 1994; Carvalho & Serafini, 1996; Hobbs, 1999).

Das hortaliças analisadas, quatro marcas distintas (A, B, C e E) apresentaram cepas de estafilococos coagulase positiva. Todas tiveram suas contagens aumentadas após armazenamento sob refrigeração ($<7^{\circ}\text{C}$), durante o prazo recomendado pelos fabricantes. Destas, as amostras de salsão apresentaram contagens iniciais bastante elevadas $>10^4$ UFC/g e $>10^5$ UFC/g, após armazenamento, indicando risco de patogenicidade e produção de enterotoxinas comprovada pelos testes realizados pela FUNED/MG, que evidenciaram a presença de enterotoxina estafilocócica não específica nas amostras. Amostras de salada clássica para o preparo de tepanyaki apresentaram contagens iniciais de $7,1 \times 10^2$ UFC g^{-1} e finais de $1,4 \times 10^6$ UFC g^{-1} , tendo sido evidenciada a presença de enterotoxina estafilocócica tipo B, confirmando o grande risco de produção de toxinfecção alimentar. As amostras de saladas mistas, não foram consideradas produtoras de toxinas. A exceção foi a tri-salada, embora tenha apresentado índices $>10^4$ e as amostras de rúcula e broto de alfafa,

que tiveram índices $>10^3$ indicando condições higiênico-sanitárias de produção inadequadas segundo a Portaria nº451 (Brasil, 1997) (Tabela 1).

TABELA 1 Comparação entre as médias de contagens (\log_{10}/g) de estafilococos coagulase positivos em hortaliças e saladas cruas minimamente processadas

PRODUTO/MARCA	<i>Staphylococcus</i> \log_{10}/g	
	Data de fabricação	Data de validade
Acelga	<1	<1
Agrião	<1	<1
Alface crespo	<1	<1
Alface romana	<1	<1
Almeirão	<1	1.15
Broto de alfafa	3.39	3.77
Beterraba	<1	<1
Cenoura em tirinhas	<1	<1
Cenoura fatiada	<1	<1
Cenoura ralada	<1	<1
Espinafre	<1	<1
Escarola	<1	<1
Rúcula	2.26	3.26
Salsão*	4.0	5.74
Salada brisa	4.78	<1
Salada clássica	2.85	6.15
Salada primavera**	5.25	5.36
Tri-salada	<1	<1

Contagens acima dos padrões e recomendações ($>10^3$) para *Staphylococcus* coagulase positivos.

* Presença de enterotoxinas inespecíficas

** Presença de enterotoxina estafilocócica tipo B (SEB)

A Figura 4a representa o percentual de estafilococos coagulase positivos em produtos hortícolas e saladas mistas MP. Observa-se que 25%, 70% e 100% das saladas mistas, hortaliças folhosas e raízes e tubérculos, respectivamente, apresentaram contagens iniciais $<1 \log_{10}/g$ do produto, enquanto os índices finais <1 foram mostrados em 50%, 60% e 100%, respectivamente (Figura 4b). Índices iniciais entre 2 a 4 \log_{10}/g são mostrados em 30% das hortaliças folhosas, 0% das raízes e tubérculos e 50% das saladas analisadas. Os índices

finais encontram-se aumentados em 30% das hortaliças folhosas e 0% das raízes e tubérculos, e em 50% das saladas mistas. O percentual de amostras que apresentaram contagens finais $>4\log_{10}/g$ foi de 10% das hortaliças folhosas, e 50% das saladas mistas. Os tubérculos não registraram índices >4 em nenhum momento das análises.

Embora as contagens iniciais de colônias típicas e atípicas de *S. aureus* em BPA tenham sido elevadas, entre $1,12 \times 10^3$ à $9,05 \times 10^5$, as colônias isoladas para identificação bioquímica não foram positivas para o teste de coagulase. Mesmo que na maioria, fossem cocos Gram e catalase positivos. Algumas cepas mostraram-se como bacilos Gram positivos esporulados, não indicando, portanto, o risco de toxinfecção estafilocócica por estes produtos mas levantando a suspeita da presença de outro microrganismo toxigênio, o *Bacillus cereus* (Tabela 2).

Segundo Pereira et al. (2000), estafilococos enterotoxigênicos são aqueles, em sua grande maioria, produtores de coagulase e representados por *Staphylococcus aureus*. Quando presentes no alimento em número suficiente, sintetizam enterotoxinas que, ao serem ingeridas, após incubação de 1 a 4 horas, ocasionam sintomas de gastroenterites.

Quando o crescimento de *S. aureus* é permitido no alimento, este pode produzir toxinas que, muitas vezes, estão presentes, embora a bactéria tenha sido destruída pelo processamento. As enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis, podendo manterem-se ativas até quando submetidas a autoclavagem a 120°C por 20 min. Por outro lado, o crescimento de cepas enterotoxigênicas em torno de 10^6 ou mais UFC por grama de alimento é geralmente considerado suficiente para que haja produção de toxinas em quantidade suficiente para produzir enfermidade no consumidor (Berdoll, 1990; Park et al., 1994; Pereira et al., 1999; Sharma et al., 2000). De acordo com Park et al. (1994), cerca de 100 a 200 ng/g de enterotoxina (SE) são suficientes para

produzir sintomas de toxinfecção.

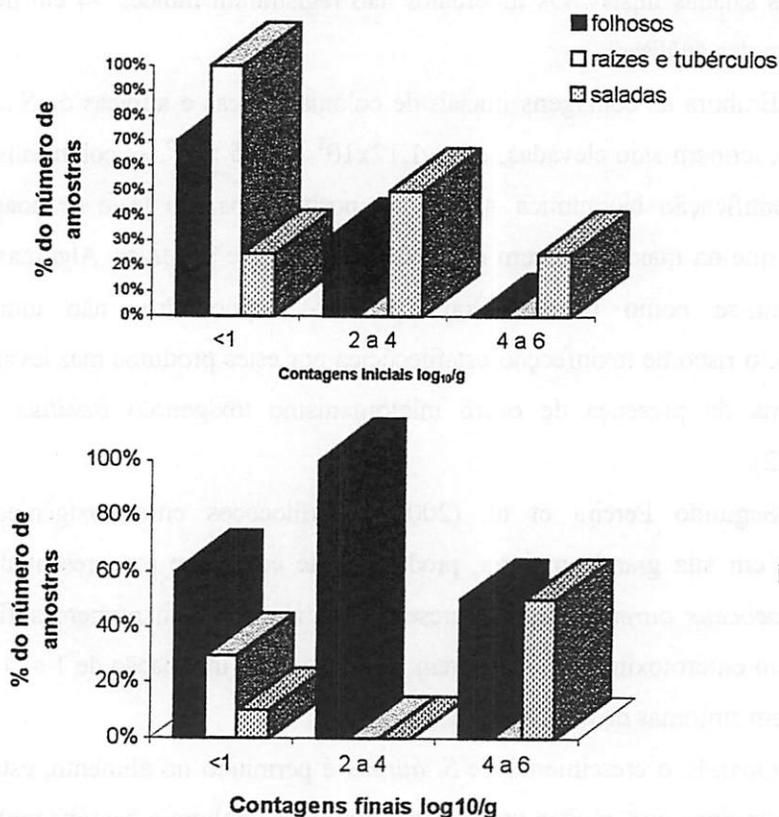


FIGURA 4 Percentual de *Staphylococcus* coagulase positivos em produtos hortícolas minimamente processados

A incidência de *S. aureus* e produção de enterotoxina são baixas em produtos vegetais, segundo Neumaye & Kramer (1990) e Beuchat (1996), quando comparada com os produtos animais. De acordo com os autores, isto é decorrente da ação antagônica da microbiota natural presente em vegetais crus não tratados. Além disso os *S. aureus* não são bons competidores com outros microrganismos pertencentes a microbiota epífita. De acordo com Beuchat

(1996), provavelmente o crescimento dos estafilococos precede o desenvolvimento da microbiota não patogênica o que explicaria sua baixa incidência nestes produtos.

A Tabela 2 representa o percentual de risco oferecido entre as oito marcas analisadas. A "Marca A" foi a que apresentou maior número de produtos com contagens $>10^3$ UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positivos (16,43%), incluindo a presença de enterotoxinas em dois dos produtos analisados. Do total de 140 amostras 23,57% mostraram contagens superiores a 10^3 UFCg¹.

Nguyen-the & Carlin (1994) apresentam dados sobre a ocorrência de *Staphylococcus aureus* potencialmente toxigenos em 3% a 14% das amostras de hortaliças frescas minimamente processadas nos Estados Unidos. Pesquisas realizadas por Mohd-Som et al., (1994) com brócolis MP embalados sob atmosfera modificada (AM) e mantidos sob refrigeração, não detectaram a presença deste agente, mas consideraram que a presença de cocos Gram positivos em maior percentual nas amostras embaladas que nas não embaladas pode ser importante indicador de risco. A capacidade do *Staphylococcus aureus* para se reproduzir em vegetais embalados a vácuo parcial foi também observada por Silva Jr. et al. (1994), onde observaram que houve uma redução no número de cepas cultivadas. Concluíam os autores que isto tenha ocorrido, provavelmente, devido à competição metabólica causada pela presença de *Escherichia coli*.

TABELA 2 Comparação percentual do risco de toxinfecção alimentar estafilocócica oferecido pelas distintas marcas analisadas

MARCAS	Nº total de produtos analisados	Total de produtos com contagens >10 ³	% de amostras contaminadas
A	40	23	16.43
B	15	-	0
C	25	5	3.57
D	20	-	0
E	5	5	3.57
F	5	-	0
G	10	-	0
H	10	-	0
TOTAL	140	33	23.57

5.2 *Bacillus cereus*

A ocorrência de *Bacillus cereus* em circunstâncias normais nos alimentos encontra-se, segundo alguns autores, quase sempre <10² a 10³/g. Nesses índices, o organismo pode ser inócuo já que são consideradas necessárias taxas >10⁵/g para a produção de toxinas e assim veicular enfermidade (Gilbert et al., 1974; ICMSF, 1996).

As contagens iniciais para *Bacillus cereus* vistas na Tabela 3 variaram de 2,8x10³ UFC g⁻¹ a 3,3 x 10⁵. Das 140 amostras, 43,75% das hortaliças folhosas (acelga, agrião, almeirão, broto de alface, espinafre, rúcula e salsão) apresentaram contagens superiores a 10² UFC g⁻¹, sendo que, deste percentual, 28,57% foram >10⁵ UFC g⁻¹, indicando risco de produção de toxina.

Após o período de estocagem sob refrigeração, apenas um produto (almeirão) apresentou contagens >10⁵ UFC g⁻¹ tendo as demais amostras reduzido seus índices abaixo de 10² UFC g⁻¹. Pode-se, então, considerar que *B. cereus* apresentou baixa resistência à temperatura de estocagem (7±1°C). Mas, considerando que as temperaturas praticadas pelos estabelecimento de comercialização visitados variaram entre 18° a 22°C, esses microrganismos poderiam ter se multiplicado nos produtos alcançando índices perigosos (dados

não apresentados).

Para vários autores, a incidência de *Bacillus cereus* em hortaliças pode ser alta, considerando que este encontra-se bastante difundido na natureza sendo geralmente isolado no solo, poeira, água doce e sedimentos. Conseqüentemente, não é surpreendente encontrá-lo nos produtos agrícolas (Gilbert et al., 1974; Delazari et al., 1978; Mossel & Garcia, 1983; Rodriguez & Barret, 1986; Harmon & Kautter, 1991; Beecker et al., 1994; Fermanian et al., 1994; Jay, 1994; Vasconcelos & Rabinovitch, 1995; Notermans & Batt, 1998a; Helgason et al., 2000; Kim et al., 2000).

De acordo com Notermans & Batt (1998), todo tipo de alimento no qual o *B. cereus* for isolado e onde o manuseio ou o armazenamento permitiu sua multiplicação, deve ser considerado veículo potencial para toxinfecção alimentar. Ressalta o autor que taxas do agente presente nos alimentos $\geq 1 \times 10^4$ *B. cereus* g⁻¹ do produto devem ser consideradas altamente perigosas.

As condições de temperatura após o processamento de produtos frescos são apontadas, por diversos autores, como sendo fundamentais para preservação dos alimentos. Quando não observadas, oferecem risco potencial de proliferação de microrganismos patogênicos e/ou toxígenos como o *B. cereus* e, conseqüentemente favorecem a esporulação e produção de toxinas por esses agentes (Wigginton, 1974; Scott, 1989; Brackett, 1994; Bennik et al., 1996; Nguyen-the & Carlin, 1994).

Pesquisas demonstraram que 44% dos alimentos prontos para consumo e 52% de produtos cárneos e vegetais analisados estavam contaminados com *B. cereus* (Rodriguez & Barret, 1986; Brackett, 1987b; Beecker, 1994).

TABELA 3. Determinações médias de *B. cereus* em hortaliças folhosas minimamente processadas comercializadas em supermercados (Belo Horizonte, MG; Campinas, SP/2000)

PRODUTO	Data de fabricação	Data de validade
	UFC g ⁻¹	UFC g ⁻¹
Acelga	1,3 x 10 ⁴	<10 ²
Acelga	<10 ²	<10 ²
Agrião	2,0 x 10 ⁵	<10 ²
Alface crespo	<10 ²	<10 ²
Alface crespo	<10 ²	<10 ²
Alface crespo	<10 ²	<10 ²
Alface romana	<10 ²	<10 ²
Almeirão	9,33 x 10 ³	2,71 x 10 ⁵
Broto de alfafa	3,3 x 10 ⁵	<10 ²
Escarola	<10 ²	<10 ²
Escarola	<10 ²	<10 ²
Espinafre	1,5 x 10 ⁴	<10 ²
Espinafre	<10 ²	<10 ²
Rúcula	<10 ²	<10 ²
Rúcula	2,4 x 10 ⁴	<10 ²
Salsão	2,8 x 10 ³	<10 ²

Dados apresentados por Nguyen-the & Carlin (1994) e Beuchat (1996a), sobre a presença de *B. cereus* em broto de feijão, soja, mostarda e agrião, conduzem à suposição de que a presença desta bactéria não é resultado de uma contaminação durante o processamento. Provavelmente, ela se deve à sua presença no ambiente de cultivo ou quando os produtos são manuseados de forma que permita a esporulação e, conseqüentemente, a produção de toxinas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, 50% das amostras apresentaram contagens iniciais >10² para saladas mistas MP. As contagens médias variaram entre 6,5x10³ a 3,5 x 10⁵UFC g⁻¹, observando que a salada brisa, marca A, apresentou índices >10⁵ UFC g⁻¹ indicando risco de produção de toxina pelo *B. cereus*, de acordo com a Portaria nº451 SVS-MS (Brasil,1997). Embora a RDC12/Brasil (Brasil, 2001) não apresente padrões

microbiológicos para este agente em saladas vegetais cruas prontas para o consumo, vários autores revelam que a incidência de *B. cereus* é muito alta em produtos vegetais frescos (Harmon & Kautter, 1991; Jay, 1994; Fermanian, 1994; Notermans & Batt, 1998).

A patogenicidade do *B. cereus* é indicada pela presença de duas enterotoxinas. Sua presença pode indicar, segundo Nortemans & Batt (1998), contaminação da matéria-prima, bem com condições inadequadas de conservação, relacionadas, geralmente, à temperatura insuficiente para armazenamento e comercialização.

TABELA 4. Contagens médias de *Bacillus cereus* em saladas mistas minimamente processadas comercializadas em supermercado (BH, MG e Campinas, SP/2000)

PRODUTO	MARCA	Data de fabricação UFC g ⁻¹	Data de validade UFC g ⁻¹
Salada primavera	A	<10 ²	<10 ²
Salada clássica (tepanyaki)	A	6,5 x 10 ²	<10 ²
Tri – salada	C	<10 ²	<10 ²
Salada brisa	A	3,5 x 10 ⁵	<10 ²

Os principais fatores citados envolvendo surtos de doenças veiculadas por este agente incluem a utilização de alimentos crus ou ingredientes contaminados por esporos, resfriamento ou cozimento inadequados, equipamento contaminado, tempo entre o preparo e consumo igual ou superior a 12 horas, entre outros (Gilbert et al., 1974; Harmon & Kautter, 1991; Beecker et al., 1994; ICMSF, 1998). Contudo, poucos são os dados disponíveis na literatura relacionados aos aspectos epidemiológicos envolvendo *B. cereus*. Trabalhos desenvolvidos na Hungria, no período de 1960 a 1968, revelaram que, do total de surtos envolvendo *B. cereus*, 10,6% vegetais (CDC, 1978).

No Brasil, não existem dados epidemiológicos sobre a ocorrência de

enfermidades ocasionadas pelo consumo de *B. cereus* em vegetais e informações sobre surtos envolvendo outros alimentos são também escassas. Segundo Eiroa (1989), isto decorre do fato destas doenças não serem obrigatoriamente notificadas. Além disso, há falta de pessoal qualificado nos locais onde os surtos acontecem e é bastante freqüente os responsáveis minimizarem a importância do fato nos locais onde tais incidentes ocorrem, procurando sufoca-lo imediatamente para evitar manifestações incômodas.

Observando-se os resultados da Tabela 5, verifica-se que somente as amostras de cenoura em tirinhas MP apresentaram contagens iniciais superiores a 10^4 UFC g^{-1} . Elas correspondem a 25% das amostras analisadas, sendo que estas contagens reduziram para abaixo de 10^2 após armazenamento sob refrigeração.

As médias das contagens após a estocagem a $7^{\circ}C$ por 5 a 8 dias foram inferiores à 10^2 UFC g^{-1} confirmando nossas suposições de que estas temperaturas foram suficientes para inibir o crescimento do *B. cereus*.

Embora a detecção de toxina produzida por *B. cereus* não tenha sido verificada em nossos estudos, a presença destes em números $>10^5$ UFC g^{-1} é tida, por vários autores, como sendo de grande risco para a produção de enterotoxinas em alimentos, inviabilizando com isto o consumo destes produtos (Hobbs & Gilbert, 1974; ICMSF, 1998; Notermans & Batt, 1998; FDA, 1998).

De acordo com Gilbert et al. (1974), os casos de toxinfecções raramente são produzidos por alimentos com índices de 10^4 ou 10^5 UFC g^{-1} ou ml^{-1} de *B. cereus* nos alimentos. Assim, embora a patogenicidade do *B. cereus* seja indicada pela presença de suas toxinas, sua presença em números elevados nos alimentos pode indicar contaminação da matéria-prima, bem como condições inadequadas de conservação relacionadas à temperatura.

TABELA 5. Contagens médias de *Bacillus cereus* em hortaliças (raízes e tubérculos) minimamente processadas comercializadas em supermercados (BH-MG; Campinas-SP/2000)

PRODUTO	MARCA	Data de fabricação UFC g ⁻¹	Data de validade UFC g ⁻¹
Cenoura em tirinha	C	8,7 x 10 ⁴	<10 ²
Cenoura fatiada	F	<10 ²	<10 ²
Cenoura ralada	H	<10 ²	<10 ²
Beterraba fatiada	C	<10 ²	<10 ²

5.3 *Listeria* sp.

Das cepas selecionadas para caracterização e identificação, 123 mostram-se no exame bacterioscópico como cocobacilos Gram, e catalase positivas. Algumas das cepas isoladas mostraram-se como cocos Gram e catalase positivos. Hofer et al. (2000), em seus estudos, verificaram que a maior fonte de erro na fase primária de identificação foi a interpretação do exame bacterioscópico, particularmente devido à presença de cocos Gram positivos dispostos em pares, simulando frequentemente formas cocobacilares. A mesma dificuldade foi observada neste trabalho, sendo muitas vezes requerida a repetição dos testes para sanar dúvidas quanto à característica morfológica das cepas selecionadas.

Outro aspecto levantado pelos autores foi a possibilidade de execução ou interpretação do teste de motilidade. Algumas vezes, ele é executado com procedimentos de inoculação, temperatura e tempo de incubação inapropriados.

Os resultados expressos na Tabela 6 referem-se ao isolamento e identificação de *Listeria* em produtos hortícolas minimamente processados. Do total de amostras analisadas 172 cepas características foram isoladas para confirmação em testes morfológicos e provas bioquímicas. Destas, 28,49% foram positivas para a presença de *Listeria* sp, estando presente em duas marcas distintas no agrião, além das amostras de acelga, almeirão e beterraba fatiada

MP.

Não foi isolada *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras encaminhadas para identificação sorológica, embora os testes bioquímicos efetuados fossem característicos, principalmente para motilidade a 25°C.

As cepas mostraram-se em sua maioria como sendo *Listeria innocua* sorovar 6a (12,21%) e *Listeria innocua* não tipável (16,28%). Os sorovars 6a e 6b são descritos como linhagens não patogênicas de diferentes espécies de *Listeria* (Pereira & Rocourt, 1993; Bell & Kyriakides, 2000; Hofer et al., 2000).

Estudos conduzidos por Hofer & Pova (1984) reportam que, durante o período de 1965 a 1983, utilizando amostras de *Listeria monocytogenes* obtidas a partir de processos patológicos e de portadores humanos, os sorovars 4b e 1/2a foram predominantes. Estudos realizados em diferentes amostras, incluindo alimentos e constituintes ambientais, no período de 1971 a 1997 mostraram que 72,9% das cepas recuperadas pertenciam ao sorovars 4b, 1/2a, e 1/2b (Hofer et al., 2000).

O estreito relacionamento da *L. monocytogenes* com as plantas e o solo sugere uma grande chance de que produtos hortícolas minimamente processados possam estar contaminados por este agente. Segundo vários autores, o maior surto de listeriose humana traçado pela história foi associado ao consumo de salada crua de repolho (Brackett, 1987a; Messina et al., 1988; Rocourt, 1996; Baek et al., 2000). Outras pesquisas revelam também a implicação de alface, tomate e aipo em casos de listeriose (Brackett, 1987a; Hofer et al., 1975), enquanto estudos citados por Eiroa (1990) evidenciam principalmente o consumo de alface, tomate, salsão e repolho como veiculadores de surtos.

A presença de *Listeria monocytogenes* é citada em produtos prontos para o consumo, envolvendo carnes, peixes, queijos e saladas. Em 3,1% das saladas analisadas foram constatadas contagens entre 0,04 a 1,0 UFC g⁻¹; 0,2% entre 10² a 10⁴ UFC g⁻¹ e nenhuma amostra com contagem superior a 10⁴ UFC g⁻¹ (Teufel

& Bendzulla, 1994, citados por Notermans et al., 1998). Sizmur & Walker (1994) também encontraram, no Reino Unido, *Listeria monocytogenes* em quatro das sessenta saladas prontas para o consumo analisadas (Beuchat, 1996a). Pesquisas conduzidas por Harvey & Gilmour (1993) reportam que 7 de 66 amostras de saladas de hortaliças pré-preparadas produzidas na Irlanda do Norte continham *Listeria monocytogenes*.

Segundo Berrang et al. (1989), esta bactéria é capaz de crescer sob temperaturas inferiores a 4°C e, assim, a sua presença em produtos minimamente processados oferece risco de disseminação e possível veiculação de enfermidade ao consumidor. Trabalhos citados por Carlin et al. (1995) mostram que esta bactéria foi isolada a partir de amostras de hortaliças frescas MP em frequências que variaram de 0 a 19% das amostras. Outros estudos confirmam também estes dados (Brackett, 1992; Bennik et al., 1996; Babic & Watada, 1996), enquanto outros mostram que *L. monocytogenes* foi capaz de sobreviver e crescer em hortaliças cruas ou processadas, refrigeradas, tais como aspargos, brócolis e couve-flor (Berrang et al., 1989), alface (Steinbruegg et al., 1988; Beuchat & Brackett, 1990), repolho fatiado (Kallander et al., 1991).

Durante a avaliação de produtos prontos para o consumo em supermercados dos subúrbios de Tokyo, vegetais crus minimamente processados foram positivos para *Listeria Murray* e *Listeria Welshimer* em 3,7% das 27 amostras analisadas (Kaneko et al.; 1999).

De acordo com Ryser & Marth (1988), esses produtos geralmente não sofrem tratamento listericida. Dessa forma, possibilita-se a infecção. Para Bennik et al. (1996) e Rocourt (1996) a sobrevivência e crescimento da *L. monocytogenes* decorre da interferência de vários fatores. Entre eles existem indicações de que a microbiota epífita presente pode interagir com o agente, inibindo ou retardando seu crescimento.

Após o enriquecimento em LEB-24horas, LEB-48 horas e LEB-7 dias,

as taxas de isolamento e recuperação de listeria foram de 5%, 35% e 60%, respectivamente. Para acelga fatiada MP, a maior seletividade ocorreu quando os cultivos foram realizados após 48 horas de incubação em LEB (66,66%) e para o agrião MP ocorreu após 7 dias de incubação (83,33%).

Dos meios utilizados, o ágar Oxford (OXA) mostrou-se mais seletivo para *Listeria* que o ágar PALCAM, indicando a presença 67,35% de colônias característica nos produtos contra 32,65% respectivamente. A diferença seletiva entre o agar PALCAM e o agar OXA vem sendo ressaltada e sua substituição é sugerida pela metodologia atual (FDA, 2001).

TABELA 6 Isolamento de *Listeria* em produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados de Belo Horizonte, MG e Campinas, SP

PRODUTO	MARCA	MEIO DE ISOLAMENTO		IDENTIFICAÇÃO*
		LEB/OXA	LEB/ PALCAM	
Acelga	H	12	6	<i>Listeria innocua</i> sorovar 6 ^a
Almeirão	A	3	0	<i>Listeria innocua</i> sorovar 6 ^a
Agrião	B	8	8	<i>Listeria innocua</i> não tipicavel
Agrião	C	7	2	<i>Listeria innocua</i> não tipicavel
Beterraba	C	3	0	<i>Listeria innocua</i> não tipicavel
TOTAL				
% de colônias isoladas		67.35	32.65	
Identificação realizada pelo FIOCRUZ				

A ocorrência de *L. monocytogenes* em alface, repolho, salsa e agrião, foi determinada no Brasil, em várias épocas do ano, por Porto & Eiroa (2001). A incidência da bactéria foi determinada a partir do enriquecimento em caldo e incubado a 4°C, por 30 dias, com posterior isolamento em ágar PALCAM e Oxford. A incidência total de *L. monocytogenes* nas hortaliças examinadas foi de

3,2%. A população detectada em alface foi de 1,2 NMP/g, não sendo detectada a bactéria em nenhuma das amostras de repolho analisadas. Os autores informam que o isolamento do organismo ocorreu em 62,5% no mês de janeiro, 12,5% em junho e 25% no mês de julho. Entretanto os autores não fizeram nenhuma comparação entre a seletividade dos meios Oxford e PALCAM. Por outro lado, Pao & Davis (2001) consideram que modificações do método padrão para determinar a presença e a população de microrganismos patogênicos em frutos e hortaliças são necessárias, considerando que os vários tipos de produtos sanitizantes, temperaturas e tratamentos de estocagem a que são submetidos durante o processamento pode interferir na recuperação dos patógenos aí presentes em meios comuns.

A dimensão da sobrevivência e proliferação da microbiota presente em hortaliças minimamente processadas é uma proposta difícil. Existem muitos parâmetros a serem considerados e são poucas as pesquisas realizadas com respeito à atuação de patógenos na ecologia microbiana desses produtos. Vários autores demonstram que o perfil da microbiota muda durante o período de estocagem, estando particularmente influenciado pelas taxas de temperatura e O₂ e CO₂. Por outro lado, durante o período de estocagem a contagem total de mesófilos tende a decrescer, dando lugar a uma microbiota psicrotrófica geralmente patogêna.

6 Conclusões

Em nossos estudos pudemos observar que:

Houve um aumento significativo das contagens de *S. aureus* durante o período de estocagem sob refrigeração indicado nas embalagens pelos fabricantes, confirmando que as condições de embalagem e armazenamento não são adequadas para conservação e segurança sanitária dos produtos.

Cepas de estafilococos coagulase positivas são produtoras de toxinfecção alimentar e algumas coagulase negativas podem também apresentar esta característica, além do poder invasivo dos estafilococos, quando em número superior a 10³ UFC/g, pode-se afirmar que 57,7% das amostras analisadas apresentam contaminação perigosa.

26,9% das amostras apresentaram contagens >10⁵ UFC/g, índice considerado como de alto risco para produção de toxinas por *Staphylococcus aureus*. Destas, 1% foi positiva para enterotoxina B (SEB) e 1,98% apresentou toxinas inespecíficas.

Os produtos da Marca A oferecem grande risco para produzir surtos de toxinfecção alimentar por *S. aureus* aos consumidores, devido a detecção de enterotoxina tipo B (SEB) e enterotoxinas não específicas.

A incidência de *B. cereus* nas amostras analisadas de produtos vegetais minimamente processados foi de 33,33%; 4,28% apresentaram índices superiores a 10⁵ UFC g⁻¹, oferecendo, assim, risco de toxinfecção alimentar.

Após o período de estocagem sob refrigeração a 7°C, durante 5 a 8 dias, observou-se uma redução dos números iniciais de *Bacillus cereus*. Exceção ocorreu com as amostras de almeirão, que tiveram suas contagens iniciais aumentadas em 2 ciclos log₁₀/g .

As temperaturas de conservação ministradas nos supermercados não são suficientes para inibir a presença e multiplicação de *S. aureus* e *B. cereus*, e, conseqüentemente, impedir a produção de toxina por estes agentes.

Embora a presença de *Listeria monocytogenes* não tenha sido detectada nas amostras analisadas, a identificação de *Listeria innocua* sorovar 6a em 12,21% e 16,28% de *Listeria innocua* não tipável, serve de alerta para que pesquisas sejam realizadas rotineiramente nestes produtos, para evitar o risco eminente deste patógeno para a saúde pública.

7 Referências bibliográficas

- BRASIL. Ministério da Saúde. Serviço de Vigilância Sanitária. Portaria N.º 451 Regulamento técnico de princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, e seus anexos. 19/09/1997. Brasília, 1997.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º12. 02 jan. 2001. Disponível em: <<file:///Anvisa-Legislação-Resolução.htm>> Acesso em: 26 jan. 2001.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, 1992.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Bacteriological Analytical** 7.ed. Arlington, 1992.
- BABIC, I. ; WATADA, A. E. Microbial populations of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmospheres. **Postharvest Biology Technology**, v. 9, p. 187-193, 1996.
- BAEK, S-Y. et al. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. **Journal of Food Protection**, v.63, n.2, p.186-189, 2000.
- BAUMAN, H. E. The HACCP concept and microbiological hazard categories. **Food Technology**, v. 28, n.9, p.30-34, 1974.
- BEECKER, H. et al. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n.1, p.1-15, 1994.
- BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *Listeria*: una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Zaragoza-Espanha: Acribia, 2000. 173 p.

BENNIK, M. H. J. et al. Microbiology of minimally processed modified-atmosphere packaged chicory endive. **Postharvest Biology and Technology**, v.9, p. 209-221, 1996.

BERDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**. V.10, n.2, p.91-100, mar.1990.

BERGEY'S MANUAL® OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. **Bacteriological Analytical Manual**. 9.ed. Baltimore; Willians & Wilkins, 1994. 1687p.

BERRANG , M. E.; BRACKETT, R. E. ; BEUCHAT, L. R. Growth of *Listeria monocytogenes* on fresh vegetables stored under controlled atmosphere. **Journal of Food Protection**, v.52, n.10, p.702-705, Oct. 1989.

BERRANG , M. E.; BRACKETT, R. E. ; BEUCHAT, L. R. Microbial, color and textural qualities of fresh asparagus, broccoli, and cauliflower stored under controlled atmosphere. **Journal of Food Protection**, v.53, n. ,p.391-395, 1990.

BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on lettuce as influenced by. **Journal of Food Science**, v.55, n.3, p755-758, May/June 1990.

BEUCHATT, L. R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, v.59, n.2, p.204-216, Feb. 1996a.

BEUCHATT, L. R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**, v.7, n.4/5, p. 223-228, 1996b.

BOLIN, H.R. et al. Factors affecting the storage stability of shredded lettuce. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, p. 1319-1321, 1977.

BOLIN, H.R. ; HUXSOLL, C. C. Storage stability of minimally processed fruit. **Journal Food Processing Preservation**, v.13, p. 281-289, 1989.

BRACKETT, R. E. Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 50, n.12, p.999-1003, Dec. 1987a.

- BRACKETT, R. E. Microbiological consequences of minimally processed fruit and vegetables. **Journal of Food Quality**, v.10, n.6, p.195-206, June 1987b.
- BRACKETT, R. E. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. **Journal of Food Protection**, v.55, n.10, p.808-814, Oct. 1992.
- BRACKETT, R. E. Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. In: WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits & vegetables**. New York: Chapman & Hall, London, 1994. p.269-312.
- CARLIN, F.; NGUYEN-the, C.; SILVA, A. A. da. Factores affecting the growth of *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh endive. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, n.4, p.636-646, 1995.
- CARVALHO, C. O. ; SERAFINI, A. B. Grupos de microrganismos isolados da orofaringe, nasofaringe e das mãos dos trabalhadores de restaurante universitário da Universidade Federal de Goiás. **Revista Higiene Alimentar**, v.10, n.45, p.19-124, Sept./Oct. 1996.
- CASTRO, M. M. de M.V. ; IARIA, S. T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no vestibulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de Hospitais municipais de João Pessoa, Pb. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.18, n. , p.235-245, 1984.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreaks of foodborne disease in United States. **Journal Infections Diseases**, Washington, n.2, p.213-217, 1978.
- CHANG, T. C.; HUANG, S. H. Evaluation of coagulase activity and protein A production for the identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, v.58, n.8, p.858-862, Aug. 1995.
- CORLETT JR., D. A.; refrigerated foods and use of hazard analysis and critical control point principles. **Food Technology**, v.43, n.2, p.91-94, Feb. 1989.

DELAZARI, I. et al. *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, n.60, p.31-40, nov./dez. 1978.

EIROA, M. N. U. Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causado por alimentos processados. **Coletânea ITAL**, Campinas, v.19, n.2, p.101-102, jul./dez. 1989.

EIROA, M. N. U. *Listeria monocytogenes* - Características, ocorrência e desenvolvimento em alimentos. **Coletânea ITAL**, Campinas, v.20, n.1, p.13-22, 1990.

FERMANIAN, C.; FREMY, J. M.; CLAISSE, M. Effect of temperature on the vegetative growth of type and field strains of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, n.6, p.414-418, Dec. 1994.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual for foods**. 7.ed. Washington: Association of Official and Analytical Chemistry, 1995.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables**. p. 1-41, Oct. 1998. Disponível em: <<http://www.fodsafety.gov/~dms/>>. Acesso em: 20 jan. 1999

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Listeria monocytogenes*. **Bacteriological analytical manual online**. 2001. Cap. 10, p. 1-11. Disponível em: <<file:///c:/microbiologia/mastite/fda-cfsan>>. Acesso em: 13 ago. 2001.

GAY, J. M. ; FOX, L. K. *Staphylococcus aureus* detection: does the staph-AB test fit? Disponível em: <www.uwrf.edu/biotech/workshop/activity/act/16/annexd3.htm>. Acesso em 03 set. 2001.

GILBERT, R. J.; STRINGER, M. F. ; PEACE, T. C.; The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of poisoning. **Journal Hygiene**, Great Britain, v.73, p.433-444, May 1974.

- GOEPFERT, J. M. ; SPIRA, W. M. ; KIM, H. U. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. **Journal of Milk and Food Tecnology**, v.35, p.213, 1972.
- HARMON, S. M.; KAUTTER, D. A. Incidence and growth of *Bacillus cereus* in ready-to-serve foods. **Journal of Food Protection**, v. 54, n., p.372-374, 1991.
- HARVEY, J. ; GILMOUR, A. Occurrence and characteristics of *Listeria* produced in Northern Ireland. **International Journal Food Microbiology**, v.19, p. 193-205, 1993.
- HELGASON, E. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, e *Bacillus thuringiensis* -one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p.2627-2630, June 2000.
- HOBBS, B. C. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1999. v. 2, p.145-280.
- HOBBS, B. C. ; GILBERT, R. J. Microbiological counts in relation to food poisoning. In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF FOOD SCIENCE TECHNOLOGY**, 1974. Summary, v.3, p.159.
- HOFER, E. ; PESSOA, G. V.A. ; MELLES, C.E. A. *Listeria spp* on vegetable for human consumption. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, 6, 1975, Salvador. **Livro de resumos...** Salvador, 1975. v.6, p.175.
- HOFER, E.; POVOA, M. M. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em solos. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.79, p.45-93, 1984.
- HOFER, E. ; RIBEIRO, R. ; FEITOSA, D. P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971, to 1997. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n.5, p.615-620, set./out. 2000.
- HURST, C. William. Sanitation of lightly processed fruits and vegetables. **HortScienc**, v. 30, n.1, Feb. 1995.

HUXSOLL, C.C.; BOLIN, H.R. Processing and distribution alternatives for minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, Chicago, v. 43, p. 124-128, 1989.

IARIA, S. T. ; FURLANETTO, S. M. P. ; CAMPOS, M. L. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em Hospitais de São Paulo, 1976. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.14, n. , p.93-100, 1980.

IARIA, S. T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em doces cremosos vendidos em padarias e confeitarias do município de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 321-337, 1981.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOLOGICAL SOCIETIES. **Microbiología de los alimentos: características de los patógenos microbianos**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1998. 606p.

JAY, J. M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1994. 804p.

KALLANDER, K.D. et al. Fate of *Listeria monocytogenes* in shredded cabbage stored at 5°C and 25°C under a modified atmosphere. **Journal of Food Protection**, v. 54, n.4, p.302-304,1991.

KANEKO, K. I. et al. Bacterialcontamination of ready-to-eat foods and fresh products in retail shops and food factories. **Journal of Food Protection**, v. 62, n.6, p. 644-649, 1999.

KIM, Y-R. ; CZAJKA, J.; BATT, C. A. Development of a fluorogenic probe-based PCR assay for detection of *Bacillus cereus* in nonfat dry milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, p.1453-1459, Apr. 2000.

Mac-FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 2.ed. Baltimore: William & Wilkins, 1980. 586p.

MARTH, E. H. Extended shelf life refrigerated foods: microbiological quality and safety. **Food Technology**, v. 52, n. 2, p. 57-62, 1998.

MESSINA, M. C. et al. The effect of liquid smoke on *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.51, n.8, p.629-631, Aug. 1988.

MOHD-SOM, F. et al. Microflora changes in modified- atmosphere-packaged broccoli florets stored at refrigerated temperature. **Journal of Food Quality**, v.17, n.3, p. 347-360, 1994.

MOSSEL, D. A.; GARCIA, B.M. **Microbiologia de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1983. 375p.

NEUMAYE, L. ; KRÄMER, J. Production of enterotoxin A and thermonuclease by *Staphylococcus aureus* in legumes. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, n.3/4, p.225-234, May 1990.

NGUYEN-THE , C. ; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Food Science and Nutrition**, v.34, n.4, p.371-401, 1994.

NOTERMANS, S.; BATT, C. A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. In: MITCHELL, T.J. ; GODFREY, A.F. ; STEWART-TULL, D.E.S. **Toxins**. Oxford: Blackwell Science, 1998. 515-614p. (Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement)

NOTERMANS, S.; DUFRENNE, J.; TEUNIS, P.; CHACKRABORTY, T. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.61, n.2, p.244-248, 1998.

PAO, S. ; DAVIS, C. L. Maximizing microbiological quality of fresh orange juice by processing sanitation and fruit surface treatments. abr. 2001. Abstracts. Disponível em: <www.foodprotection.org/Publications/Abstracts/April2001.htm>. Acesso em: 11 jul. 2001.

PARK, C. E. ; AKHTAR, Ma. ; RAYMAN, M. K. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay Kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 60, n.2, p.677-681, Feb.1994.

PEREIRA, M. L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.7, n.26, p.5-12, June 1993.

PEREIRA, M. L. et al. Enterotoxinas estafilocócicas: importância e métodos analíticos de detecção. **Higiene Alimentar**, v.13, n.64, p.24-34, Sept.1999.

PEREIRA, M. L. et al. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, v.44, n.68/69, p.32-41, jan./fev. 2000.

PORTO, E.; EIROA. M.N.U. Occurrence of *Listeria monocytogenes* In: Vegetables. **FoodProtection**, Apr. 2001. Disponível em: <www.foodprotection.org/Publications/Abstracts/April2001.htm>. Acesso em: 11 jul. 2001.

RODRIGUEZ, M. H.; BARRETT, E. L. Changes in microbial population and growth of *Bacillus cereus* during storage of reconstituted dry milk. **Journal of Food Protection**, v.49, n.9, p.680-686, Sept. 1986.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, v.7, n.4/5, p.195-202, 1996.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* in cold-pack cheese food during refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, v.51, n.8, p.615-621, Aug.1988.

SCHLIMME, D. V. Marketing lightly processed fruits and vegetables. **Hort Science**, v. 30, n. 1, p.15-17, Feb. 1995.

SCOTT, V. N. Interaction of factors to control microbial spoilage of refrigerated foods. **Journal of Food Protection**, v. 52, n. 6, p. 431-435, 1989.

SHARMA, N. K.; REES, C. E. D.; DODD, C. E. R. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, p.1347-1353, Apr./2000.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo:Livraria Varela, 1997. 295p.

SILVA JR., E. A. da et al. Observação das características sensoriais e determinação das contagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em amostras de vegetais, quando submetidos a pressões reduzidas (vácuo) e baixos teores de oxigênio em recipientes rígidos. **Higiene Alimentar**, v.8, n.33, p.27-31, set. 1994.

SPERGER, W. H.; TATINI, S. -R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, v.29, n.2, p.502-505, 1975.

STEINBRUEGGE, E. G. ; MAXCY, R. B. ; LIEWEN, M.B. Fate of *Listeri monocytogenes* on ready to serve lettuce. **Journal of Food Protection**, v.51, n.8, p.596-599, Aug. 1988.

SU, Y-C.; WONG, A.C.L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v.60, n.2, p.195-202, Feb. 1997

VASCONCELLOS, F. J. M. de; RABINOVITCH, L. A new formula for an alternative medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in foods. **Journal of Food Protection**, v.58, n.3, p.235-238, Mar. 1995.

WIGGINTON, M.J. Effects of temperature, oxygen tension and relative humidity on the wound-healing process in the potato tuben. **Potato Research**, v. 17, p. 200-214, 1974.