

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Engenharia de Alimentos**

**Departamento de Ciências de Alimentos**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE FRUTAS E HORTALIÇAS  
MINIMAMENTE PROCESSADAS COMERCIALIZADAS NA  
CIDADE DE CAMPINAS / SP**

**Thaís Belo Anacleto dos Santos**

Nutricionista

**Dr. José Luiz Pereira**

Orientador

**Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira**

Co-orientadora

**Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre  
em Ciência de Alimentos**

**Campinas, 2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Sa59q Santos, Thaís Anacleto dos  
Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente  
processadas comercializadas na cidade de Campinas / SP /  
Thaís Belo Anacleto dos Santos. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: José Luiz Pereira  
Co-orientador: Valéria Christina Amstalden Junqueira  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Vegetais. 2. Minimamente processados. 3.  
Microbiologia - Qualidade. I. Pereira, José Luiz. II. Junqueira,  
Valéria Christina Amstalden. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Título em inglês: Microbiological quality of minimally processed fruits and  
vegetables

comercialized on the city of Campinas – São Paulo (Brazil)

Palavras-chave em inglês (Keywords): Vegetables, Minimally processed,  
Microbiological – Quality

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: José Luiz Pereira

Neliane Ferraz de Arruda Silveira

Mariza Landgraf

Dirce Yorika Kabuki

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. José Luiz Pereira**

Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DCA

---

**Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira**

(Membro)

Pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL

---

**Dra. Mariza Landgraf**

(Membro)

Universidade de São Paulo – USP

---

**Dra. Dirce Yorika Kabuki**

(Membro)

Faculdade de Engenharia de Alimentos – DTA

**Dedico esse trabalho à meus pais e minha irmã, por serem uma família completa e maravilhosa, me apoiarem e estarem presentes em todos os momentos da minha vida.**

**Ao Ivan por ser tão especial, amável, compreensivo e  
companheiro.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **José Luiz Pereira** por me aceitar como orientada, pelos ensinamentos e amizade.

À Dra. **Valéria C. Amstalden Junqueira** pelos valiosos ensinamentos, paciência, excelência profissional e amizade.

À **Dra. Neusely da Silva** pelas contribuições para a melhoria do trabalho e amizade.

À amiga **Rosana F. Siqueira dos Santos** por participar de minha vida durante toda a execução desse trabalho, pelos conselhos de todos os momentos e amizade.

À amiga **Karen Signori Pereira** pelas valiosas correções, informações científicas e pela sincera amizade.

Às amigas **Gabriela C. Moita** e **Sílvia A. Morelli** pela amizade.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Centro de Referência de Microbiologia do ITAL Dionir Jeremias Baptista, Marina Venturinni Copetti, Fabiana Taminato Imazaki, Larissa Ferratini, Felipe Nakano, Daniel Ponciano Lemes, Beatriz Thié Iamanaka, Maristela S. Nascimento, Cláudia Galusni Pagoto e todos aqueles que de alguma forma acompanharam o meu trabalho e participam do meu dia a dia.

Ao **CNPq** pela bolsa concedida durante o mestrado.

## ÍNDICE

|                                                                           |             |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                              | <b>XII</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                              | <b>XIII</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                                        | <b>XIV</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                      | <b>XVI</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                 | <b>1</b>    |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                      | <b>5</b>    |
| 2.1. Vegetais minimamente processados.....                                | 5           |
| 2.1.1. Etapas do fluxograma de processamento.....                         | 8           |
| 2.1.1.1. Colheita e pré-resfriamento.....                                 | 8           |
| 2.1.1.2. Transporte.....                                                  | 8           |
| 2.1.1.3. Recepção: seleção, pesagem e classificação da matéria-prima..... | 9           |
| 2.1.1.4. Higienização da matéria-prima.....                               | 9           |
| 2.1.1.4.1. Limpeza.....                                                   | 9           |
| 2.1.1.4.2. Desinfecção.....                                               | 10          |
| 2.1.1.5. Descascamento.....                                               | 11          |
| 2.1.1.6. Corte.....                                                       | 12          |
| 2.1.1.7. Enxágüe / Desinfecção.....                                       | 12          |
| 2.1.1.8. Incorporação de aditivos.....                                    | 13          |

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.1.9. Centrifugação.....                              | 14        |
| 2.1.1.10. Mistura e montagem.....                        | 14        |
| 2.1.1.11. Embalagem.....                                 | 14        |
| 2.1.1.12. Armazenamento.....                             | 15        |
| 2.1.1.13. Distribuição dos produtos.....                 | 16        |
| 2.2. Cadeia de Frio.....                                 | 17        |
| 2.3. Dados de consumo.....                               | 18        |
| 2.4. Dados epidemiológicos.....                          | 20        |
| 2.5. Microbiota de vegetais minimamente processados..... | 24        |
| 2.5.1. Microbiota inicial.....                           | 25        |
| 2.5.1.1 <i>Escherichia coli</i> .....                    | 27        |
| 2.5.1.2. <i>E. coli</i> O157:H7.....                     | 30        |
| 2.5.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> .....             | 34        |
| 2.5.1.4 <i>Salmonella</i> .....                          | 38        |
| 2.5.2. Fontes de contaminação.....                       | 44        |
| <b>3. OBJETIVO.....</b>                                  | <b>47</b> |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                       | <b>48</b> |
| 4.1. Amostragem.....                                     | 48        |
| 4.2. Preparo das amostras para análise.....              | 48        |
| 4.3. Análises microbiológicas.....                       | 49        |
| 4.3.1. Sistema Bax®.....                                 | 49        |

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.2. Determinação de <i>Salmonella sp.</i> .....                                                                         | 50        |
| 4.3.2.1. Análise do DNA.....                                                                                               | 51        |
| 4.3.3. Determinação de <i>Listeria monocytogenes</i> .....                                                                 | 52        |
| 4.3.4. Determinação de <i>E. coli</i> O157:H7.....                                                                         | 53        |
| 4.3.5. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais, bolores e leveduras, coliformes totais e <i>E. coli</i> ..... | 54        |
| 4.3.5.1. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais – Semeadura em profundidade.....                             | 55        |
| 4.3.5.2. Contagem de bolores e leveduras – Semeadura em Superfície.....                                                    | 55        |
| 4.3.5.3. Contagem de coliformes totais e fecais ( <i>E. coli</i> ) – Petrifilm EC <sup>®</sup> .....                       | 56        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                                                                      | <b>58</b> |
| 5.1. Determinação de bactérias patogênicas em vegetais minimamente processados pelo Sistema Bax <sup>®</sup> .....         | 58        |
| 5.2. Contagens de microrganismos indicadores em vegetais minimamente processados.....                                      | 61        |
| <b>6. CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                  | <b>81</b> |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                        | <b>82</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                  | <b>83</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|          |                                                                                                                                               |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 | Fluxograma de processamento mínimo de frutas e hortaliças.....                                                                                | 7  |
| FIGURA 2 | Fluxograma esquemático da determinação de <i>Salmonella</i> através do Bax System® .....                                                      | 52 |
| FIGURA 3 | Fluxograma esquemático da determinação de <i>Listeria monocytogenes</i> através do Bax System® .....                                          | 53 |
| FIGURA 4 | Fluxograma esquemático da determinação de <i>E. coli</i> O157:H7 através do Bax System® .....                                                 | 54 |
| FIGURA 5 | Fluxograma das contagens de bolores e leveduras, microrganismos aeróbios mesófilos totais, coliformes totais e fecais ( <i>E. coli</i> )..... | 57 |
| FIGURA 6 | Vegetais minimamente processados com contagens de <i>E. coli</i> acima de 2 logUFC/g.....                                                     | 71 |

## LISTA DE TABELAS

|          |                                                                                                                                                                        |    |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1 | Vegetais envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar, e microrganismos causadores, exclusivamente ou potencialmente de origem animal.....                      | 21 |
| TABELA 2 | Prevalência de <i>Salmonella</i> em vegetais minimamente processados.....                                                                                              | 42 |
| TABELA 3 | Resultado das contagens de microrganismos em hortaliças minimamente processadas (expressos em logUFC/g).....                                                           | 65 |
| TABELA 4 | Resultado das contagens de microrganismos em frutas minimamente processadas (expressos em logUFC/g).....                                                               | 69 |
| TABELA 5 | Relação entre vegetais minimamente processados com contagens de <i>E. coli</i> acima do limite tolerável e vida útil do produto na data da análise microbiológica..... | 74 |
| TABELA 6 | Distribuição das amostras de vegetais minimamente processados, em relação à população de aeróbios mesófilos totais e coliformes totais.....                            | 76 |
| TABELA 7 | Valores mínimos e máximos de contagens de coliformes totais, aeróbios mesófilos e bolores e leveduras em hortaliças e frutas minimamente processadas.....              | 78 |
| TABELA 8 | Relação entre contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais e data de análise de vegetais minimamente processados.....                                          | 79 |

## RESUMO

O consumo de alimentos processados aumentou consideravelmente nas últimas décadas, provocando mudanças nos hábitos de compra, conservação e preparo dos alimentos, preferindo-se cada vez mais produtos que exijam menos tempo para preparo doméstico. Além disso, a conscientização das pessoas quanto à importância do equilíbrio nutricional, faz com que alimentos mais saudáveis não só estejam presentes regularmente em sua alimentação, como também constituam sua base, incluindo-se as frutas, hortaliças e legumes, ricos em vitaminas, sais minerais e fibras, que auxiliam no bom funcionamento do organismo como um todo e ajudam a prevenir o aparecimento de doenças crônico-degenerativas. Vegetais minimamente processados podem ser definidos como produtos que, embora fisicamente alterados, permanecem em estado fresco e, na maioria das vezes, não necessitam de cocção antes do consumo. Esses alimentos, por serem consumidos diretamente, representam elevado risco na disseminação de microrganismos patogênicos, quando produzidos de forma inadequada, especialmente em relação às práticas agrícolas e higiênicas. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi verificar as condições microbiológicas, tanto em relação à presença de patógenos quanto ao perfil higiênico-sanitário, de frutas e hortaliças minimamente processadas comercializadas na cidade de Campinas – SP, coletadas nos pontos de venda final. Das 180 amostras analisadas, nenhuma apresentou as bactérias patogênicas *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*. Em relação à qualidade higiênico-sanitária, 52 amostras (36,9%) apresentaram-se em desacordo com os limites máximos toleráveis estabelecidos na legislação vigente para o parâmetro indicador de contaminação fecal, confirmado até *Escherichia coli*. A contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos apresentou-se acima de 6logUFC/g em 87,74% das amostras de hortaliças e 60% das frutas, assim como a contagem de coliformes totais, em 45,6% das hortaliças e 30% das frutas. Na quantificação de bolores e leveduras, valores acima de 4logUFC/g foram determinados em 58,06% das amostras de hortaliças e 68% das frutas. Algumas contagens em amostras coletadas próximas à data de fabricação

foram superiores a de outras amostras coletadas perto do final do prazo de validade.

**Palavras-chave:** vegetais, minimamente processados, qualidade microbiológica

## ABSTRACT

The consumption of processed food increased considerably in the past decades, making changes in the people purchase habits, conservation and preparation of foods. Consumers prefer more and more food products that demand less time to prepare. Moreover, the people awareness about the importance of the nutritional balance, makes that healthful foods been regularly present in its feeding and constitute its base, including in its diet, fruits and vegetables, rich in vitamins, mineral salts and fibres, that assist in the organism good functioning and help to prevent the appearance of chronic-degenerative illnesses. Minimally processed fruits or vegetables can be defined as products that, even so physically modified, keep the freshness and do not need subsequent preparation before consumption. These foods, that are consumed directly in most case, have been frequently associated with foodborne diseases being able to transmit pathogenic microorganisms, important to the public health. The aim of this study was to verify the microbiological conditions ( counts of indicator microorganisms and loud of pathogens relevants for public health) of minimally processed fruits and vegetables, commercialized in the city of Campinas – SP, Brazil. In none of the 180 samples analyzed was detected *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*. In relation to the hygienical-sanitary condition, 52 samples (36,9%) were in disagreement with the maximum tolerable limits, established by the current legislation for the indicating parameter of fecal contamination, confirmed as *Escherichia coli*. The total counting of mesophilic aerobic microorganisms was above 6logCFU/g in 87,74% of the vegetables and in 60% of the fruits analysed samples, as well as the counting of total coliformes, in 45,6% of vegetables and 30% of fruits. The mould and yeast counts present values above 4logCFU/g in 58,06% of the vegetables and 68% of the fruits samples. Some samples collected in the beggining of the shelf-life had higher counts than others collected at the end of the shelf-life.

**Keywords:** vegetables, minimally processed, microbiological quality

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por hortaliças e frutas frescas, associada à conveniência da vida atual, tem incentivado o interesse em produtos minimamente processados por muitos consumidores. Uma mudança comportamental vem ocorrendo, principalmente no que diz respeito aos padrões de consumo de alimentos de origem vegetal e, proporcionalmente, um grande aumento na venda desses produtos tem sido constatada na última década (PILON, 2003; ROSA, 2000).

O número de pessoas que buscam uma alimentação mais saudável e equilibrada aumenta a cada dia. Uma maior ingestão de frutas, verduras e legumes vem substituindo os elevados teores calóricos de dietas ricas em carboidratos e gorduras. Essa preocupação com a saúde se deve à estreita relação entre alimentação e doenças crônicas. Cerca de dois terços das mortes ocorridas nos Estados Unidos são causadas por doenças crônicas e dentre as 10 causas que levam à morte, 4 estão associadas à dieta, sendo essas, doença cardíaca, infarto, alguns tipos de câncer e diabetes (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2002).

Agências governamentais e organizações americanas para a promoção da saúde estão recomendando cada vez mais a redução de gorduras e sal nas refeições assim como um aumento no consumo de hortaliças, frutas e cereais, sob o ponto de vista de que esse tipo de dieta reduz os riscos de doenças cardíacas e incidência de câncer (MAISTRO, 2001).

Essa mudança de comportamento também está diretamente associada à crescente colocação da mulher no mercado de trabalho e, como a administração e execução das tarefas domésticas continuam, na maioria das vezes, sob sua responsabilidade, justifica-se, assim, o impacto de produtos mais práticos, que necessitem de um menor tempo para preparo (SILVA et al., 2004). A participação de mulheres no mercado de trabalho representava 28% por volta de 1971 enquanto em 1998 esse índice aumentou para 40%. Vale ressaltar ainda que

nesse período o total despendido com alimentação fora de casa aumentou 11,9% (SOUZA, 2001).

O tempo de permanência com a família, por exemplo, tornou-se uma das maiores preocupações da população feminina, voltadas cada vez mais para seu trabalho fora do lar e, dessa forma, o tempo utilizado no preparo de refeições está se tornando cada vez menor. De acordo com Souza (2001), em 1934 eram gastos 150 minutos nessa atividade, em 1974 esse tempo foi reduzido para 30 minutos e já em 1994 esse período passou a ser de 15 minutos.

Em países desenvolvidos a aquisição de alimentos prontos para o consumo é extremamente comum devido à sua conveniência e frescor, aliados às características de saúde e bem-estar amplamente vinculadas a produtos de origem vegetal, e vêm ganhando cada vez mais popularidade nos países em desenvolvimento (LANDGRAF; NUNES, 2006; WANG, 2006).

As frutas e hortaliças são tecidos vivos perecíveis e, como tal, estão sujeitas a deteriorações, com redução das características de qualidade como sabor, textura, cor e valor nutritivo. Essas transformações aumentam a susceptibilidade ao ataque de microrganismos que, além de diminuir a qualidade e vida útil dos produtos, podem comprometer a saúde dos consumidores, constituindo assim um risco à saúde pública (CHITARRA, 1998).

Vale salientar também que frutas e hortaliças, em geral, são consumidas cruas, não passando, portanto, por tratamento térmico ou outro tipo de processamento que possa eliminar microrganismos patogênicos ou não. A contaminação microbiana dos tecidos vegetais pode ocorrer em diferentes fases da cadeia produtiva, desde sua produção no campo até a chegada ao consumidor final, sendo que a higienização a que são submetidos não elimina totalmente a carga microbiana dos produtos.

De acordo com Beuchat (2002), existe uma estreita relação entre o consumo de vegetais crus e doenças de origem alimentar e algumas das causas encontradas são: a adaptação de patógenos às condições ambientais de estresse, práticas de processamento inadequadas, maior consumo de tais alimentos,

globalização, permitindo maior intercâmbio de produtos e, conseqüentemente, de microrganismos de locais distintos.

Diversos microrganismos tais como *E. coli* e *Salmonella* já foram detectados na água de irrigação de pomares (RIORDAN et. al, 2001 apud BEUCHAT, 2006). Dessa forma, a qualidade dessa água é, muitas vezes, definitiva na seleção dos microrganismos presentes no produto final, isto é, as chances de um produto final contaminado aumentam de acordo com a qualidade da água de irrigação utilizada (CHAMBERS et al., 2002).

A qualidade do solo onde são cultivadas as hortaliças e frutas também será de fundamental importância na definição da população microbiana do produto final. Estudos mostram que *Listeria monocytogenes* pode permanecer por até 43 dias em solos com adubo compostado, sendo que esse fator aumenta as possibilidades da transmissão do patógeno para o produto fresco, ou mesmo para calçados, roupas e mãos dos trabalhadores do campo, especialmente durante os meses de inverno quando a temperatura do solo é mais baixa (JIANG, 2004 apud BEUCHAT, 2006).

A contaminação na colheita ou durante o processamento pode ocorrer de maneira cruzada entre operadores, equipamentos, contentores durante o armazenamento e transporte. O microrganismo que porventura permaneça no vegetal folhoso após a sanitização pode multiplicar-se, dependendo das condições de tempo e temperatura de conservação a que são expostos, além da umidade que se acumula na embalagem devido à respiração da hortaliça e/ou fruta. Na fase de comercialização, os microrganismos podem atingir níveis populacionais que comprometem a qualidade do produto, por reduzir sua vida útil, além de representarem um risco à saúde do consumidor (BEUCHAT, 1996b)

De acordo com o exposto acima, é de extrema importância que a qualidade microbiológica de alimentos consumidos crus, especialmente os minimamente processados prontos para o consumo seja investigada, já que diversos relatos associam seu consumo a doenças transmitidas por alimentos (FRANCIS et al., 1999; FRANK; TAKEUSHI, 1999; SHARMA et al., 2002; SAGOO et al., 2003;

CDC, 2006) e risco à saúde do consumidor, justificando plenamente a realização do presente trabalho.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Vegetais minimamente processados**

As frutas e hortaliças compõem uma parcela importante da cadeia alimentar por possuírem características que as distinguem do restante dos alimentos. Sua principal diferença em relação aos produtos de origem animal é a continuidade dos processos metabólicos internos após a colheita, como o processo de respiração, através do consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub>, assim como outros gases, além da liberação de calor, que conduz a um estado aceitável para o consumo (GONZÁLEZ-AGUILAR et al, 2005).

“Frutas” são definidas como porções suculentas e comestíveis de plantas perenes, bianuais e anuais, de matas e arbustos, que derivam de flores ou inflorescências. Esta definição inclui as frutas verdadeiras, como as cítricas, as falsas como maçãs e pêras e também as frutas compostas, como morangos. A definição de frutas também engloba o tomate, azeitonas e pepino, apesar desses serem normalmente referenciados como hortaliças (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2007) “hortaliça” é definida como planta herbácea da qual uma ou mais partes são utilizadas como alimento na sua forma natural. O produto será designado: verdura, quando utilizadas as partes verdes; legumes, quando utilizado o fruto ou a semente, especialmente das leguminosas e, raízes, tubérculos e rizomas, quando são utilizadas as partes subterrâneas.

O processamento mínimo pode ser descrito como a manipulação, preparo, embalagem e distribuição de produtos agrícolas que, embora modificados fisicamente, mantêm as mesmas características do produto in-natura, como frescor, sabor e nutrientes, inalterando suas características organolépticas

(PINHEIRO et al., 2005; ROVERSI; MASSON, 2004). As etapas de sua produção encontram-se descritas na Figura 1.

Os vegetais processados surgiram nos Estados Unidos por volta da década de 70, já a introdução efetiva de hortaliças minimamente processadas teve início no Brasil em 1994, na cidade de São Paulo, estando sua comercialização desde então concentrada nas grandes cidades, principalmente as da região sudeste, que possui os estados mais populosos (JACOMINO et al., 2004; SILVA et al., 2004).

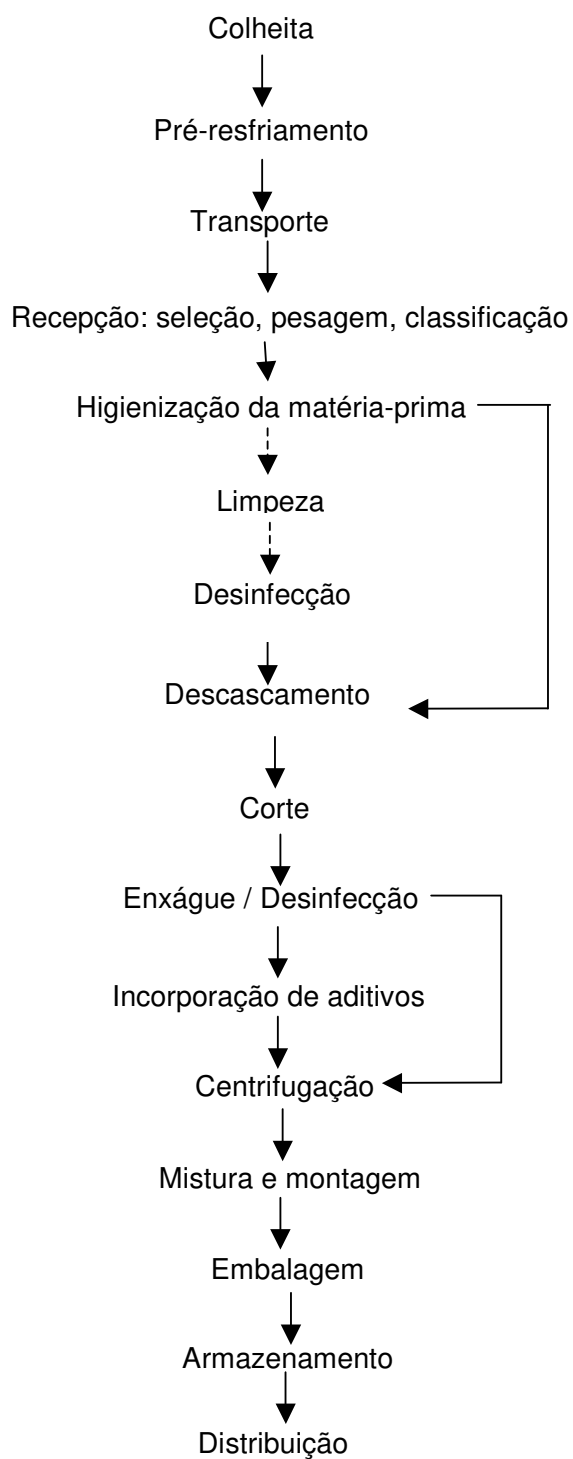


FIGURA 1. Fluxograma de processamento mínimo de frutas e hortaliças adaptado de Chitarra, 1998

### **2.1.1. Etapas do fluxograma de processamento**

De acordo com Chitarra (1998) as etapas da cadeia produtiva de hortícolas minimamente processadas, esquematizadas na Figura 1, podem ser descritas como segue:

#### **2.1.1.1. Colheita e Pré-resfriamento**

A colheita manual dos produtos hortícolas ainda é a mais utilizada por possibilitar uma seleção criteriosa dos produtos maduros. A falta de uniformidade durante essa etapa reduz a qualidade do produto final processado. As operações da colheita requerem o manuseio cuidadoso e um bom padrão de higiene no campo, com atenção especial aos seguintes pontos: remover unidades sem padrão comercial ou infectadas; limpar e desinfetar instrumentos e equipamentos utilizados na colheita e manuseio subsequêntes; verificar os procedimentos e especificações de cada produto, evitando assim injúrias físicas; realizar a colheita nos períodos mais frios do dia ou à noite; nunca colocar os produtos diretamente no solo ou expô-los às condições climáticas e/ou ambientais adversas; remover o produto colhido o mais rapidamente possível ou colocá-lo em local sombreado; se necessário realizar o resfriamento com água ou outros meios a fim de remover o calor vital e calor do campo; evitar o manuseio excessivo por torná-lo mais susceptível à degradação. O pré-resfriamento pode ser realizado no campo ou no galpão de processamento sobre as cargas, pallets ou contentores de transporte.

#### **2.1.1.2. Transporte**

O transporte do produto para a unidade de processamento deve ser realizada o mais rápido possível, com o auxílio de contentores, e sob temperatura amena. Os veículos devem estar limpos, apresentar ventilação adequada, e preferencialmente, apresentarem cobertura (toldo). Se o transporte for realizado por longas distâncias, usar veículo refrigerado. Evitar vibrações, batimentos, choques ou cargas de grande volume para não danificar o produto. Utilizar, prioritariamente, embalagens em caixas ou caixotes plásticos.

#### 2.1.1.3. Recepção: seleção, pesagem e classificação da matéria-prima

Assim que o produto chega à unidade de processamento, deve ser colocado numa câmara refrigerada de modo a remover o calor do campo, ou para manter sua baixa temperatura, caso tenha sido transportado em caminhão refrigerado.

A seleção da matéria-prima por peso e tamanho padroniza o produto final. A pesagem deve ser realizada com anotação em formulário específico, para controlar a quantidade e rendimento.

Os fatores de maior importância na classificação para a separação dos produtos de boa qualidade dos não aceitáveis são: tamanho, forma, firmeza, corte da superfície, ausência de doenças, sabor e aroma e grau de maturação. Nesse tipo de operação, vários equipamentos podem ser utilizados para facilitar as operações mecânicas de classificação, como: peneiras, esteiras, flutuação em salmoura, bem como utilização de pessoal treinado. Os produtos impróprios para o processamento devem ser descartados.

#### 2.1.1.4. Higienização da matéria-prima

A higienização corresponde à etapa de eliminação de agentes causadores de doenças, através de procedimentos adequados de limpeza e desinfecção dos produtos hortícolas.

##### 2.1.1.4.1. Limpeza

A limpeza corresponde à retirada de materiais estranhos (galhos, hastes, ramos, talos, solo, insetos, resíduos de fertilizantes), não só da matéria-prima mas também dos equipamentos e recipientes. Esse processo também pode envolver a separação do material leve do pesado por gravidade, peneiramento, coleta, etc.

Após a limpeza dos vegetais é necessária uma etapa posterior de lavagem com solução de detergente visando eliminar sujidades aderidas à superfície dos

mesmos e favorecer a remoção dos microrganismos. O detergente penetra nas membranas e ajuda a romper a parede celular dos microrganismos, facilitando, portanto, sua remoção. Alguns microrganismos como a *E. coli* não são eliminados pela lavagem apenas com água clorada por formarem quelatos com o cloro.

Os detergentes empregados devem apresentar grau de pureza adequado e para a diluição devem ser seguidas as instruções do fabricante. O tempo de imersão varia de acordo com o grau de sujeira do produto e, portanto, os que ficam em contato direto com o solo devem ficar mais tempo em contato com o detergente, o que auxilia no desprendimento das sujidades e dos microrganismos que se encontram aderidos à superfície. Esse tempo de imersão varia usualmente entre 10 e 15 minutos.

A lavagem pode ser por imersão do produto com ou sem movimentação da água, ou ainda através do uso de aspersão (spray), tambores rotatórios, escovas rotatórias ou agitação. A movimentação da água por borbulha com jato de ar possibilita o movimento do produto, eliminando resíduos de terra ou outros materiais estranhos aderidos à superfície do mesmo.

Deve-se fazer o enxágüe somente com água tratada para remoção das sujidades e do resíduo do detergente. A etapa da limpeza é importante para reduzir a quantidade do princípio ativo (cloro) que será utilizado na etapa da desinfecção, descrita a seguir.

#### 2.1.1.4.2. Desinfecção

Nessa etapa, utilizam-se agentes com atividade anti-microbiana. A legislação brasileira não menciona outros princípios ativos a não ser os clorados, ou seja, os liberadores de cloro ativo, como o hipoclorito de sódio e dicloroisocianurato. Ambos liberam cloro ativo (ácido hipocloroso), porém o segundo é mais estável em relação ao hipoclorito de sódio. Não é permitido o uso de alvejantes (misturas de substâncias como soda cáustica, perfume e outros) juntamente com o cloro.

A desinfecção de frutos e hortaliças para o processamento mínimo geralmente é realizada em câmara isolada, com número restrito de entradas, para evitar o contato humano com o produto. A água deve ser refrigerada a 4°C para abaixar a temperatura do produto, aumentando assim sua vida de prateleira.

A desinfecção com água clorada é uma das etapas mais importantes no processamento mínimo, por reduzir a carga microbiana da superfície do produto, sendo o tratamento por imersão um efetivo meio para a eliminação da maioria dos microrganismos que tenham permanecido após a lavagem com o detergente.

Tal etapa é realizada em cuba ou tanque com água clorada contendo 100 a 200 ppm de cloro ativo (ideal de 120 a 150 ppm) por 10 a 15 minutos.

Deve-se fazer o enxágüe final com água potável, contendo de 2 a 5 ppm de cloro (água tratada comum) para eliminação dos resíduos. Após as operações de limpeza e desinfecção é que se procede o descascamento das hortícolas.

#### 2.1.1.5. Descascamento

Pode ser realizado de várias maneiras de acordo com o tipo de produto, de forma manual ou mecânica. Pode requerer o uso de tratamentos químicos e térmicos como: vapor de água em ebulição; lixívia por soluções alcalinas (NaOH ou KOH); vapor sob alta pressão; soluções ácidas.

O descascamento industrial é realizado mecanicamente por meio químico ou com vapor sob alta pressão. Já o manual é lento, oneroso e causa perda de parte do produto.

A lixívia é usualmente utilizada para pêssegos, pêras e tomates e requer alto suprimento de água, hidróxido de sódio (NaOH) e fonte de calor. Raízes, tubérculos e bulbos (batata, cenoura, beterraba, cebola) são descascados mecanicamente ou por lixívia. O produto deve ser manuseado com o máximo de cuidado para evitar danos ao mesmo. Após o descascamento podem ser realizadas as aparas e retirada do miolo ou talos, antes do corte, de acordo com o tipo de produto.

#### 2.1.1.6. Corte

O corte pode ser realizado por diferentes meios, através dos quais os frutos e hortaliças são transformados em peças menores, com forma definida e tamanho uniforme. É uma etapa importante por facilitar o manuseio, apresentando, contudo, algumas desvantagens.

O dano mecânico às células do vegetal causado pelo corte aumenta a respiração dos tecidos, tornando-os mais susceptíveis à deterioração. Esses produtos devem ser imediatamente refrigerados a 4°C após o corte.

As facas devem estar bastante afiadas e finas de modo a obter-se um corte satisfatório, com o mínimo de dano ao produto. Devem ser de aço inoxidável e afiadas após cada oito horas de uso. Elas possuem formato diferente para cada tipo de corte. O tamanho da peça é definido de acordo com o tipo de produto e com o ajuste das facas.

Os equipamentos de corte são centrífugas de alta velocidade com lâminas ou facas de corte horizontal ou vertical para fatiar, picar, retalhar, cortar em cubos, tiras, rodela, entre outros. Os equipamentos devem ser bem lavados após cada operação.

A vida de prateleira para muitos produtos pode ser aumentada quando se reduz o impacto entre a máquina e o produto ou entre os pedaços do próprio produto.

#### 2.1.1.7. Enxágüe / Desinfecção

Após o corte, os produtos podem ou não ser enxaguados em água clorada para a retirada dos exudatos celulares e imersos ou pulverizados com soluções de aditivos químicos (conservantes ou preservativos).

Deve-se fazer o enxágüe final com água potável, contendo de 2 a 5 ppm de cloro (água tratada comum) para eliminação dos resíduos.

De acordo com Moretti e Puschmann (2006), a desinfecção deve ser realizada após o corte, de modo que o produto a ser sanitizado deve ser imerso

rapidamente em solução de água clorada, com 150 a 200mg/L de cloro livre, próxima a 5°C, durante 10 minutos.

O pH da solução sanitizante é extremamente importante pois dele depende a eficiência da solução. O ideal é que o pH da solução seja mantido entre 6,5 e 7,5, podendo ser ajustado com hidróxido de sódio e ácidos cítricos (MORETTI; PUSCHMANN, 2006).

O cloro pode se oxidar incompletamente com materiais orgânicos, levando à formação de produtos indesejáveis, como o clorofórmio e outros trihalometanos. Em pH alcalino, o cloro reage com bases nitrogenadas para produzir cloraminas. A alta reatividade do cloro com matéria orgânica na presença de oxigênio reduz o teor de cloro livre na água, recomendando-se portanto, a troca da solução sanitizante após 2 ou 3 usos, ou quando o nível de cloro livre for inferior a 100mg/L (MORETTI & PUSCHMANN, 2006).

Após a lavagem com solução clorada forte, é preciso fazer o enxágüe dos produtos, utilizando para isso água tratada com concentração de 2 a 5mg de cloro ativo.

#### 2.1.1.8. Incorporação de aditivos

Os produtos minimamente processados podem ser submetidos a alguns tratamentos para melhorar sua estabilidade durante o armazenamento e distribuição. Os aditivos químicos são incorporados para retardar o crescimento superficial de leveduras, bolores e bactérias, bem como para manter as características de qualidade (cor, sabor, aroma, textura). A preservação química pode ser realizada pelo uso de substâncias químicas naturais ou sintéticas. Os tratamentos químicos, quando utilizados, não devem prejudicar nenhum fator isoladamente do produto. Por exemplo, se utilizado para manter a cor, não deve prejudicar sabor ou aroma. Devem ser aplicados como aditivos nutricionais tais como, ácido ascórbico e cálcio.

Em alguns produtos, como na alface fatiada, esses tratamentos não são benéficos, porém a lavagem para a remoção dos fluídos celulares aumenta a vida

de prateleira. Os aditivos mais utilizados em processamento mínimo são: antioxidantes, acidulantes, agentes quelantes, conservadores, entre outros.

#### 2.1.1.9. Centrifugação

A remoção da água de lavagem e do excesso de água do produto (exsudatos) é uma etapa crítica pois água em excesso no alimento pronto pode estimular o crescimento microbiano. É realizada em equipamentos próprios (centrífugas) que operam em alta rotação. O grau de secagem depende da rotação e do tempo de funcionamento estabelecidos. Usualmente a centrifugação é realizada em poucos minutos, pois a secagem excessiva deve ser evitada visando a não ocorrência de enrugamento ou murchamento dos produtos.

As operações de corte, lavagem e centrifugação devem ser realizadas em um curto espaço de tempo, não excedendo 30 minutos.

#### 2.1.1.10. Mistura e montagem

São operações realizadas para a obtenção de alimentos combinados como saladas e refeições prontas para o uso. A mistura deve ser homogênea, formada com gasto mínimo de energia e custos possíveis.

O local utilizado para a realização da mistura é o mais crítico da cadeia de processamento, devendo haver uma rigorosa higiene e assepsia. O ar no ambiente deve ser filtrado, a temperatura controlada entre 10-12°C ou inferior, com umidade relativa entre 60 e 70%. Os operadores devem usar roupas especiais, máscara, touca e luvas.

#### 2.1.1.11. Embalagem

Embora o sistema mais comum de embalagem seja o de sacos ou filmes plásticos, outros também podem ser empregados como bandejas ou recipiente plástico transparente envolto em filmes flexíveis laminados ou bandejas duplas. Outros elementos de suporte como travessas e caixas são também utilizados no sistema global de embalagens.

Os equipamentos mais usados para embalar os produtos são os que dão forma à embalagem, enchem e selam na horizontal ou vertical; os que enchem a travessa e colocam o envoltório plástico, ou ainda os do sistema de enchimento/selagem do saco plástico pré-formado. Usualmente, utiliza-se uma massa de 200 a 400g do produto para um volume total da embalagem duas a três vezes maior.

A seleção da embalagem apropriada para produtos minimamente processados exige o conhecimento prévio das características do produto, como taxa de respiração, produção de etileno, entre outras. Do mesmo modo, a permeabilidade a gases para cada tipo de filme polimérico é determinada pela espessura e quantidade do material e do método de processamento. Dessa forma a escolha da embalagem requer a otimização dos fatores físicos, químicos e ambientais.

Alguns autores relatam que o crescimento de microrganismos pode ser retardado pelo uso de atmosfera modificada na embalagem do produto (baixa concentração de O<sub>2</sub> e elevada de CO<sub>2</sub> . Porém o método pode acarretar a condensação de água, modificando o perfil do desenvolvimento microbiano, com o crescimento de bactérias lácticas e outras acídicas e gram-positivas.

Atenção especial deve ser dada a produtos com pH elevado e com intensa atividade respiratória. A embalagem desses produtos em filmes poliméricos flexíveis com restrição à passagem de O<sub>2</sub> para seu interior pode permitir o desenvolvimento de *Clostridium botulinum*, com produção de toxina letal para o homem.

A especificação da embalagem para cada tipo de produto deve ser realizada por profissionais qualificados. O uso de embalagem inadequada pode trazer resultados adversos, prejudicando a qualidade do produto e sua vida de prateleira.

#### 2.1.1.12. Armazenamento

O armazenamento refrigerado é realizado em ambiente com temperatura inferior a 5°C. Pode ser efetuado em conjunto com outros métodos tais como atmosfera controlada, atmosfera modificada, ar, vácuo, entre outros.

As câmaras para armazenamento com uso de atmosfera controlada ou modificada são construídas de modo similar às de armazenamento refrigerado. É utilizado isolamento adequado e barreiras de vapor, devendo a superfície fria ser suficientemente elevada para assegurar a alta umidade relativa e circulação do ar. São usados sistemas de controle para regular a massa e o volume do produto, a temperatura, a pressão, o tempo, a concentração de gases (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e etileno), a percentagem de umidade relativa e outras variáveis para manter a qualidade do produto.

Os gases individuais podem ser adicionados a partir de cilindros pressurizados ou tanques insulados ou ainda por queimadores catalíticos que consomem O<sub>2</sub> e produzem CO<sub>2</sub>. As câmaras devem ser equipadas com filtros de ar para prevenir a contaminação microbiana.

O armazenamento pode ser a curto, médio ou longo prazo para produtos embalados para comercialização em atacado ou varejo. O empilhamento dos produtos deve permitir a passagem livre de gases ao seu redor durante o armazenamento.

A utilização de baixos percentuais de umidade relativa (UR) no ambiente de armazenamento causam a transpiração e conseqüente murchamento do produto. Em contrapartida, elevada UR no armazenamento com flutuações na temperatura devem ser evitadas por causarem condensação da água, com formação de gotículas na superfície do produto, o que facilita o espalhamento e crescimento microbiano.

#### 2.1.1.13. Distribuição dos produtos

A distribuição dos minimamente processados deve ser a mais rápida possível. A seleção e estabelecimento do sistema de distribuição envolve investimento elevado, podendo ser o fator determinante no sucesso ou fracasso

da estratégia de comercialização. O suprimento do produto deve ser ajustado à demanda do mercado de forma rápida e fácil.

No período de 3 a 10 dias de distribuição, o produto é manuseado entre quatro e seis vezes nas operações de carregamento, descarregamento e organização na prateleira. A vida útil do mesmo é aumentada pelo controle apropriado das condições de armazenamento e de transporte.

O transporte deve ser rápido e cuidadoso. Quanto maior a quantidade de produto minimamente processado, mais difícil se torna o sistema de distribuição. É de fundamental importância evitar as flutuações de temperatura, devendo esta ser controlada de forma continuada.

## **2.2. Cadeia de frio**

Sabe-se que as condições de armazenamento são aspectos de extrema importância pois afetam tanto a população final quanto os tipos de microrganismos que crescem em produtos *in natura*. A temperatura, concentração de gases e umidade relativa na embalagem são os fatores de maior influência sobre a microbiota e a determinação da vida útil do produto (ROSA, 2002).

As temperaturas entre 0°C e 3°C podem aumentar a vida útil de vegetais minimamente processados entre 5 e 18 dias, já que a degradação qualitativa dos produtos pode ser retardada pela diminuição da temperatura, ocasionando uma redução na taxa respiratória do vegetal, com conseqüente redução nas perdas sensoriais (PILON, 2003).

Em países desenvolvidos, onde a cadeia de frio é mantida durante todas as etapas de processamento do alimento, os vegetais minimamente processados possuem uma vida útil entre 14 e 21 dias, já que são mantidos a 4°C durante toda a cadeia produtiva. No Brasil o prazo máximo fornecido por algumas empresas é de até 7 dias e a temperatura dos balcões refrigerados onde ficam as hortaliças e

frutas minimamente processadas pode variar entre 5°C e 15°C, de acordo com Maistro (2005), permitindo a multiplicação de microrganismos e conseqüentemente acelerando a deterioração do produto.

Pesquisa realizada em Campinas – SP por Silveira et al. (2003) verificou que, em média, a validade dos vegetais não folhosos é de cinco dias, mas pode chegar à sete. As empresas de maior porte e mais agressivas comercialmente, geralmente têm prazo um a dois dias superiores aos prazos indicados pelas menores.

Os vegetais folhosos têm validade média de cinco dias, porém, de maneira geral, não são produzidos pelas empresas de menor porte (com exceção da couve fatiada). A justificativa dessas empresas é a de que não conseguem um bom prazo de validade para seus produtos porque, no varejo, não são mantidos sob refrigeração. Essas empresas colocam seus produtos principalmente em varejões, que realmente não conservam os minimamente processados sob refrigeração.

Temperaturas de estocagem variando entre 4°C e 10°C promoverão a seleção da microbiota predominante, ou seja, microrganismos psicotróficos. Como algumas bactérias patogênicas toleram temperaturas de refrigeração, como a *Listeria monocytogenes*, maior atenção deve ser dada à temperatura de armazenamento desses produtos (BRACKET, 1987; BABIC; WATADA, 1996; BENNIK et al., 1998; FRANCIS et al., 1999).

### **2.3. Dados de consumo**

O consumo *per capita* de hortaliças no Brasil varia de 25 a 30 kg/ano nas regiões Norte e Nordeste, e de 45 a 50 kg/ano nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Essas médias são bastante inferiores àquelas observadas em outros países, principalmente da Europa, Ásia e América do Norte, onde o consumo por indivíduo atinge aproximadamente 100 a 110 kg/ano. Porém, tem sido observado

um aumento de 6 a 10% nas quantidades consumidas em nosso país, devido às mudanças dos hábitos de vida e alimentares da população (MAKISHIMA, apud PILON, 2003).

Nos EUA de 1970 para 1995 o consumo de vegetais passou de 64 para 140 Kg / habitante / ano (SATO, 2005). Souza apud Sato (2005) relata que, no Brasil, a venda de frutas, verduras e legumes nas grandes redes de supermercados é responsável por 10 a 13% do faturamento total, aumentando, assim, o espaço ocupado por esses produtos nas gôndolas de supermercados.

Estima-se que o varejo de minimamente processados tenha movimentado no ano de 1999 um milhão de unidades de produto, arrecadando cerca de R\$100 milhões, 20% a mais que em 1998 (SILVA, 2004). Em 2001, de acordo com a Associação Brasileira de Supermercados (ABRAS), o montante obtido a partir da venda de hortaliças processadas chegou a U\$4 milhões/mês nos supermercados (MAISTRO, 2005) enquanto que nos Estados Unidos o capital proveniente da comercialização de tais produtos, no ano de 2006, foi de U\$12 bilhões.

Dados mostram que a participação desses produtos no consumo total de hortifrutis comercializados em redes supermercadistas do Estado de São Paulo é de 4,2% e 1,6%, respectivamente, nas classes de maior e menor poder aquisitivo, sendo que nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro esse valor é de aproximadamente 1%, com tendência à ascensão (JACOMINO et al., 2004).

A comercialização dos minimamente processados é realizada através de dois tipos de mercado, o institucional e o varejista. O primeiro abrange empresas do ramo alimentício, como restaurantes “*self-service*”, tradicionais, unidades de alimentação e nutrição – UAN’s - (cozinhas industriais) assim como hospitais, escolas, *catering* que utilizam esse tipo de produto devido, principalmente às vantagens logísticas proporcionadas, além de menor custo final de produção e padronização do produto (SILVA et al., 2004).

Dados do mercado institucional mostram que o consumo de vegetais minimamente processados, no mês de fevereiro, foi de 300.000 Kg , enquanto o de in-natura de 3.000.000 Kg. Portanto, pode-se dizer que o consumo de vegetais

minimamente processados representou 10% do total de hortaliças e frutas adquiridas, nesse período, pela GR/SA, empresa que terceiriza serviços de refeições coletivas, pertencente ao grupo Accor® (IKEDO, 2006).

Já no mercado varejista, de acordo com dados do Ministério da Integração Nacional, os vegetais minimamente processados são tidos como produtos preferencialmente consumidos por 32% dos consumidores de São Paulo, 30% do Ceará, 29% do Distrito Federal e Goiás, 13% do Rio de Janeiro e 12% de Minas Gerais. Um dos motivos, no caso dos consumidores de São Paulo, seria o aumento de cerca de 5 vezes na variedade de produtos disponibilizados ao consumo assim como um aumento no número de empresas no ramo, de 3 em 1994 para 15 em 1999 (SILVA et al., 2004).

Pesquisa realizada pela *Associação Brasileira de Supermercados* (ABRAS) em 2001 revelou que os consumidores de hortaliças e frutas minimamente processadas são, em sua maioria, mulheres que moram sozinhas, com idade média de 39 anos e renda mensal de 16 salários mínimos (MAISTRO, 2006).

Sendo assim, os produtos minimamente processados estão cada dia mais presentes no cotidiano da população brasileira, chegando a ela tanto através do mercado institucional quanto do varejista, tornando extremamente necessário o controle de sua qualidade higiênico-sanitária.

## **2.4. Dados epidemiológicos**

Tradicionalmente, as frutas e hortaliças não eram alvo de muita preocupação por parte de órgãos reguladores, por serem prioritariamente preparados e rapidamente consumidos no âmbito doméstico. Atualmente, como passaram a ser cada vez mais manipulados pelas indústrias de minimamente processados e consumidos através de restaurantes e cozinhas industriais, o cenário mudou. A preocupação com o risco potencial para a saúde pública

cresceu, pois muitas operações como corte, lavagem e embalagem são feitas manualmente, aumentando a possibilidade de contaminação.

Sendo assim, estudos começaram a ser realizados e pôde-se constatar que tais alimentos são fontes potenciais de microrganismos relevantes em saúde pública, sendo freqüentemente incriminados em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em várias partes do mundo. As bactérias, parasitas e vírus mais comumente implicados em doenças transmitidas por alimentos, são de origem animal, como pode ser observado na Tabela 1.

De acordo com a *International Fresh-cut Produce Association* (IFPA) (IFPA, 1997), Frank e Takeushi (1999), Codex Alimentarius (2001) e Sharma et al., (2002), hortaliças folhosas, especialmente alface, têm sido identificadas como veículos de patógenos como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Shigella*. Nos Estados Unidos, por exemplo, os alimentos mais freqüentemente implicados em surtos provocados por cepas de *E. coli* enteropatogênica, no período de 1993 a 1997, foram a carne bovina (25%) e as frutas e hortaliças (20%) (OLSEN et al., 2000).

**Tabela 1.** Vegetais envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar, e microrganismos causadores, exclusivamente ou potencialmente de origem animal

| PATÓGENO                                 | PRODUTO                                                                                           |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Bactérias</b>                         |                                                                                                   |
| <i>Campylobacter jejuni</i>              | Alface, saladas                                                                                   |
| <i>Clostridium botulinum</i>             | Repolho, saladas,                                                                                 |
| <i>Clostridium perfringens</i>           | Saladas                                                                                           |
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7          | Brotos de alfafa, cidra de maçã, melões, repolho, salada de frutas, alface, broto de rabanete     |
| <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica | Cenouras                                                                                          |
| <i>Listeria monocytogenes</i>            | Salada de repolho, aipo, alface, tomate                                                           |
| <i>Salmonella</i>                        | Broto de alfafa, suco de maçã, melão, salada de frutas, alface, suco de laranja, tomate, melancia |
| <i>Shigella flexneri</i>                 | Salada de frutas, cebolas verdes                                                                  |

**Tabela 1.** Continuação

| <b>PATÓGENO</b>                    | <b>PRODUTO</b>                                            |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <i>Shigella sonnei</i>             | Alface, melancia                                          |
| <i>Vibrio cholerae</i>             | Salada de repolho, vegetais crus                          |
| <i>Yersinia enterocolitica</i>     | Broto de feijão                                           |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | Alface                                                    |
| <b>Parasitas</b>                   |                                                           |
| <b>PATÓGENO</b>                    | <b>PRODUTO</b>                                            |
| <i>Cyclospora cayetanensis</i>     | Amora, alface, framboesa, vegetais crus                   |
| <i>Cryptosporidium parvum</i>      | Cebolas verdes, vegetais crus                             |
| <i>Giardia lamblia</i>             | Alface, cebola, tomate                                    |
| <b>Vírus</b>                       |                                                           |
| Calcivírus                         | Saladas                                                   |
| Hepatite A                         | Alface, tomate, couve                                     |
| Norovírus                          | Salsão, repolho, saladas verdes, salada de frutas, melão. |

Fonte: Beuchat, 2006

A rota de contaminação mais comum é o contato do alimento com material fecal durante seu processamento, devido às precárias práticas higiênico-sanitárias dos manipuladores, que muitas vezes contaminam os alimentos através de suas mãos, inadequadamente sanitizadas (IFPA, 1997).

Os esporos de *Clostridium botulinum* estão naturalmente presentes no solo onde crescem frutas e hortaliças e, apesar da doença causada por esse microrganismo ser bastante perigosa e inclusive fatal, não existem praticamente relatos que associem o consumo desses alimentos com surtos de doença de origem alimentar (IFPA, 1997).

Os dois primeiros grandes surtos associados à vegetais, causados por *Listeria monocytogenes*, ocorreram em 1979 e 1981 nos Estados Unidos e Canadá, respectivamente. O primeiro, em Boston, acometeu 23 pessoas de 8 hospitais que consumiram uma salada de vegetais com salsão, tomate e alface, tendo 5 pacientes ido a óbito. Já o segundo acometeu 34 crianças e 7 adultos com respectivas 15 e 2 mortes. O alimento envolvido no surto foi uma salada de

repolho, cenoura e tomate (“coleslaw”), tendo sido o repolho o veículo de transmissão (FRANCIS, 1999).

Entre 1980 e 1999, 12 surtos de listeriose ocorreram em diferentes países, sendo que o maior deles ocorreu na Itália em 1997, onde 1566 pessoas que ingeriram salada de milho foram atingidas (AURELI, 2000; SCHLECH, 2000).

Surtos envolvendo *Salmonella* são bastante freqüentes e têm sido associados ao consumo de diversos vegetais, como broto de feijão (O’MAHONI, 1990), tomates crus (WOOD, 1991 apud BEUCHAT, 1996; HEDBERG et al., 1994), salada de repolho (FRANCIS et al., 1999), alface e salada de vegetais folhosos (SAGOO et. al., 2003), brotos de alfafa, melão, sucos de maçã e laranja não pasteurizados (BEUCHAT, 1998; PHLS, 2000; STAFFORD, 2001). Quanto à *E. coli* O157: H7 os alimentos de origem vegetal envolvidos em surtos, com relato em literatura são suco de maçã não pasteurizado, melões, alface, saladas, broto de rabanete, broto de alfafa e espinafre (SILVA et al., 2003).

De acordo com o *Center for Diseases Control* (CDC), entre 2000 e 2004 ocorreram, nos Estados Unidos, 1548 e 1845 surtos de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella*, respectivamente, envolvendo frutas e hortaliças, dentre elas melancia, uvas vermelha e verde, pêra, melão, manga, alface, espinafre, broto de alfafa, tomate, repolho, cenoura, tomate cereja, saladas verdes, salada de frutas, entre outras. Os locais de consumo desses alimentos foram diversos, tais como: restaurantes, hospitais, escolas, campo, piqueniques, local de trabalho, casa e cadeia (CDC, 2006). Vale lembrar que a maioria dos surtos possui causa “desconhecida”, portanto os números acima refletem parte da realidade da ocorrência de doenças de origem alimentar, mesmo em países como os Estados Unidos que possuem um eficiente sistema de vigilância epidemiológica.

Recentemente um surto de *E. coli* O157:H7 acometeu 199 indivíduos nos Estados Unidos, após o consumo de espinafre contaminado com o patógeno. A averiguação dos fatos mostrou que o veículo de contaminação do microrganismo foram fezes de gado, que entraram em contato com o alimento na fazenda onde

era cultivado. Vale ressaltar que 3 pessoas foram a óbito, dentre elas uma criança de 2 anos (CDC, 2006).

## **2.5. Microbiota de vegetais minimamente processados**

Tanto frutos quanto hortaliças contêm vários nutrientes que podem ser utilizados por microrganismos patogênicos e deteriorantes, permitindo sua colonização nesses alimentos. O conteúdo de água dos vegetais é de, aproximadamente 95%, cerca de 8,6% de carboidratos, 1,9% de proteínas, e 0,3% de gordura, sendo que o pH oscila entre 6,0 e 7,0. O pH das frutas varia entre 2,5 a 4,5, exceto as cerejas cujo valor oscila entre 6,2 e 6,7. Alguns frutos apresentam elevados teores de sólidos solúveis, variando entre 6 e 25% (expresso em sacarose) (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

As frutas e hortaliças apresentam atividade de água ( $A_w$ ) em torno de 0,95 ou superior, permitindo o crescimento de muitos microrganismos. A baixa umidade no interior da embalagem dificulta o crescimento de bactérias mas promove a rápida desidratação do produto, selecionando o crescimento de fungos. Já a elevada umidade facilita a condensação de gotículas sobre os produtos, servindo como difusor de microrganismos e como caldo de cultivo, por dissolver carboidratos liberados dos alimentos (PORTE & MAIA, 2001).

O baixo pH das frutas se deve à elevada quantidade de ácidos orgânicos presentes, como o cítrico, málico e tartárico. Outros nutrientes também presentes nos vegetais, e não menos relevantes que os demais são as vitaminas e minerais. Dessa forma, do ponto de vista nutricional, as frutas e hortaliças possuem os nutrientes necessários para promover o crescimento de bactérias, bolores e leveduras. Nos frutos, os elevados teores de água e baixo conteúdo de carboidratos permitem que a maior parte da água esteja na forma livre, selecionando o crescimento de bactérias acidófilas, já que apesar da disponibilidade de nutrientes, muitas bactérias possuem o crescimento inibido

pelas condições ácidas de pH, favorecendo também o crescimento de bolores e leveduras (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

Em contrapartida, as hortaliças possuem nutrientes adequados para o desenvolvimento de todos os tipos de microrganismos, porém as condições de neutralidade permitem uma proliferação bacteriana mais rápida do que de bolores e leveduras. Os altos valores de potencial de óxido-redução nas hortaliças promovem o crescimento de microrganismos aeróbios e diminuem as chances de crescimento de anaeróbios facultativos (JAY, 2005).

Rosa (2002) relata que a seleção da microbiota deteriorante desses alimentos se dá, principalmente, pelo seu teor de nutrientes. Microrganismos proteolíticos, lipolíticos e sacarolíticos crescem mais rapidamente em alimentos que contêm proteínas, lipídeos e carboidratos, respectivamente, havendo, portanto, uma seleção de acordo com a composição centesimal do alimento.

### **2.5.1. Microbiota inicial**

Sabe-se que a melhor forma de eliminar patógenos de alimentos, especialmente aqueles consumidos crus, é impedir que os microrganismos tenham acesso aos produtos, utilizando-se, desde o campo até o ponto de venda final, as boas práticas agrícolas e de fabricação. Utilizar um solo adequado, com adubo compostado, irrigar produtos com água de boa qualidade, impedir contaminação cruzada através de animais ou suas fezes, evitar abusos de temperatura durante todo o processamento e especialmente durante a estocagem são medidas que ajudam a controlar o acesso de microrganismos danosos à saúde humana aos vegetais.

O meio ambiente contribui de forma considerável para contaminação de frutas e hortaliças com patógenos de importância em saúde pública. O contato dos vegetais com água e solo contaminados (água de chuvas, insetos, animais e homem) com patógenos de origem entérica, denotam uma possível irrigação com

água contendo material fecal (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005). Além disso, a falta de higiene também pode ser apontada como causa de aparecimento de microrganismos causadores de toxinfecções alimentares (ROSA, 2002).

Os microrganismos podem ter acesso aos tecidos do vegetal durante as diversas etapas da cadeia produtiva, como elaboração, transformação e /ou armazenamento da matéria-prima. Esses microrganismos podem ou não ter acesso às células mais internas do vegetal, porém essa internalização ainda não está muito bem esclarecida (ROSA, 2002).

De acordo com Chitarra (1998), os produtos minimamente processados são mais sensíveis à deterioração do que os convencionais porque perdem seu tecido protetor (casca), isto é, a barreira física que inicialmente impede a invasão microbiana. O corte dos tecidos libera nutrientes que servem como “alimento” aos microrganismos, proporcionando uma aceleração em seu desenvolvimento. Pode-se, portanto, afirmar que o excessivo manuseio do produto aumenta sua susceptibilidade à invasão microbiana.

Vários autores já estudaram a microbiologia de hortaliças cruas, que normalmente é semelhante à dos vegetais processados e varia de acordo com o clima, práticas de cultivo, entre outros fatores (ERCOLANI, 1976; ROSAS et al., 1984; BRACKETT, 1994). De acordo com alguns estudos, os vegetais minimamente processados alojam uma microbiota diversificada, freqüentemente da ordem de  $10^5$  a  $10^7$  unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) e a população bacteriana é composta por 80 – 90% de bacilos Gram negativos, predominantemente pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Erwinia*, microrganismos psicrótrófos, ou seja, que conseguem multiplicar-se em baixas temperaturas, influenciando na qualidade dos vegetais cortados e armazenados sob refrigeração. Tais microrganismos são pectinolíticos e quebram facilmente o tecido vegetal, provocando alterações indesejáveis.

As bactérias ácido-láticas têm sido encontradas em saladas mistas e cenouras minimamente processadas submetidas a temperaturas de 30°C. (BRACKETT, 1994). Leveduras também têm sido detectadas com freqüência em

vegetais crus, minimamente processados. Embora não tenham significado como patógenos, muitas espécies fazem parte da microbiota natural das frutas e hortaliças. Quando presentes em grande número, podem provocar alterações nos produtos e, de maneira especial, naqueles já embalados, fermentando-os e modificando seu sabor e aroma característicos.

As bactérias do grupo coliformes têm sido utilizadas rotineiramente como indicadoras de qualidade de água. A presença desses microrganismos em vegetais frescos cortados e/ou minimamente processados é esperada uma vez que alguns coliformes totais fazem parte de sua microbiota natural. A contagem entre 100 a 10.000 UFC/g não é rara. Dois coliformes totais, *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* estão presentes no meio ambiente (IFPA, 1997). A eliminação desses microrganismos não patogênicos dos estabelecimentos de processamento é praticamente impossível, por estarem extremamente difundidos e espalhados no ambiente de produção (IFPA, 1997).

#### **2.5.1.1. *Escherichia coli***

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae* que, na 2ª Edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (BRENNER et al., 2005), inclui 44 gêneros e 176 espécies. No grupo dos coliformes totais estão apenas as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Mais de 20 espécies se encaixam nessa definição, sendo encontradas tanto bactérias originárias do trato gastrintestinal de humanos e outros animais de sangue quente (*Escherichia coli*), como também bactérias não entéricas (espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*, dentre outras). A capacidade de fermentar a lactose pode ser verificada pela formação de gás e/ou ácido, nos meios de cultivo contendo lactose. Essas características são utilizadas nos métodos tradicionais de contagem de coliformes totais (SILVA, 2007).

O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C, com produção de gás. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originárias do trato gastrointestinal (*E. coli*), porém, atualmente, sabe-se que o grupo também inclui membros de origem não fecal (várias cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*). Em função disso, o termo coliformes fecais tem sido, gradativamente, substituído por coliformes termotolerantes (SILVA, 2007).

*E. coli* está incluída tanto no grupo dos coliformes totais quanto no dos coliformes termotolerantes (JAY, 2005). Esse microrganismo foi inicialmente introduzido como indicador em 1892, na Austrália e em 1895 nos Estados Unidos. Foi usado para indicar a contaminação da água por matéria fecal e, conseqüentemente, alertar para a presença potencial de patógenos entéricos (*Salmonella*, por exemplo). O padrão foi mudado para coliformes totais em 1915, pelo U.S. Public Health Service, baseado na premissa de que todos os coliformes apresentavam igual valor como indicadores de contaminação fecal (SILVA, 2007).

A *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) concluíram que não é possível avaliar a segurança (inocuidade) de alimentos em função dos níveis de *E. coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias. Um alto índice desses microrganismos pode estar, em certas circunstâncias, relacionado com uma maior probabilidade de presença de patógenos entéricos, porém, freqüentemente não está. Da mesma forma, sua ausência nem sempre significa que os produtos estejam livres de bactérias entéricas patogênicas. As principais aplicações desses microrganismos como indicadores são determinar as condições de higiene dos processos de fabricação, no caso de Enterobactérias e coliformes, por serem facilmente inativados por sanitizantes e capazes de colonizar diversos nichos de plantas de processamento frente à uma sanitização ineficiente (SILVA, 2007).

A presença de coliformes também pode indicar falhas no processamento ou contaminação pós-processo em alimentos pasteurizados, pois são facilmente destruídos pelo calor e não resistem a tratamentos térmicos. Já em relação à *E. coli*, sua presença pode significar contaminação fecal em alimentos “in-natura”, mas não em alimentos processados.

No Brasil ainda não existe uma regulamentação para o setor de minimamente processados, dessa forma utiliza-se como parâmetro legislativo o disposto pela resolução normativa RDC nº 12, da ANVISA. Tal legislação estabelece padrões microbiológicos em relação à presença de *Salmonella* e quantificação de coliformes termotolerantes e dispõe os seguintes dizeres: “A denominação *coliformes a 45°C* é equivalente à denominação *coliformes de origem fecal* e de *coliformes termotolerantes*. Caso seja determinada a presença de *E. coli*, deve constar no laudo analítico”.

O que interessaria, na realidade, seria a quantificação de *E. coli* como indicador de contaminação fecal em vegetais minimamente processados, e não a presença de outros microrganismos que não sejam de origem fecal. O padrão de quantificação de *E. coli* teria muito mais significado, na legislação, para uma possível condenação de um lote, do que a quantificação de coliformes termotolerantes, que inclui também microrganismos do ambiente.

A Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004, estabelece os Procedimentos e Responsabilidades Relativos ao Controle e Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano e seu Padrão de Potabilidade, e possui uma melhor definição para tais microrganismos, visto que, em tal portaria, coliformes termotolerantes constituem “subgrupo das bactérias do grupo coliforme que fermenta a lactose a  $44,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  em 24h tendo como principal representante a *Escherichia coli*, de origem exclusivamente fecal. Essa portaria coloca como padrão microbiológico de água para consumo humano ausência de *E. coli* “ou” coliformes termotolerantes, sendo que a detecção de *E. coli* deve ser, preferencialmente adotada.

Dessa forma, os ensaios para a quantificação ou detecção de presença ou ausência de *E. coli* possuem muito mais significado quanto à avaliação de contaminação de origem fecal do que a contagem de coliformes termotolerantes, que além da *E. coli* abrigam outras espécies de microrganismos não necessariamente de origem fecal.

#### **2.5.1.2. *E. coli* O157:H7**

Em 1920 começaram a surgir evidências de que o microrganismo denominado *Bacterium coli*, renomeada posteriormente como *Escherichia coli*, poderia provocar gastroenterite com mortalidade significativa em crianças. Por volta de 1940, ficou efetivamente estabelecida a enteropatogenicidade do microrganismo *E. coli* (ICMSF, 1996).

Sendo assim, cepas de *E. coli* patogênica são definidas como bactérias capazes de causar diarreia no homem ou animais, e a subdivisão das formas patogênicas é feita de acordo com o mecanismo de cada doença (ICMSF, 1996). Atualmente existem 6 grupos de *E. coli* patogênicas reconhecidos, sendo esses: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* Shiga toxigênica (STEC) ou enterohemorrágica (EHEC) (DESMARCHELIER et al., 1997).

As cepas enteropatogênicas são diferenciadas através de testes sorológicos dos antígenos presentes em sua parede celular (antígenos “O”), envelope ou cápsula (antígenos “K”) ou flagelo (antígenos “H”) (EVANS, 1979).

A *E. coli* O157:H7 está compreendida no grupo de *E. coli* enterohemorrágica produtora de citotoxinas (verotoxinas I e II ou toxinas shiga I e II), associadas à ocorrência de enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as idades. A síndrome ocorre devido a adesão microbiana às células epiteliais intestinais e à ação de citotoxinas produzidas no intestino do indivíduo infectado

(SILVA, 2004a). Possuem crescimento pobre ou nulo a 44°C e não são capazes de utilizar o sorbitol e produzem a enzima  $\beta$ -glicuronidase (ICMSF, 1996).

O trato intestinal de ruminantes, particularmente bovinos e ovinos, parece ser o principal reservatório das cepas enterohemorrágicas de *E. coli* O157:H7. Em suínos e aves a presença parece não ser tão comum, embora já tenha sido isolada do intestino desses animais (SILVA, 2004a).

Segundo o CDC (2006), alimentos como repolho, aipo, coentro, brotos de plantas para confecção de sanduíches, saladas de vegetais mistos, melão, entre outros são os vegetais mais relacionados a surtos envolvendo o patógeno em questão.

De acordo com Silva (2004a) os alimentos geralmente incriminados em surtos são a carne bovina mal-cozida, rosbifes, hambúrgueres, salsichas, leite cru, molhos para salada, maionese e sucos de maçã. Porém, os vegetais utilizados no preparo de saladas também têm sido envolvidos na transmissão de doenças de origem alimentar, possivelmente devido à contaminação cruzada com carne contaminada (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

Estudos acerca da capacidade de sobrevivência do microrganismo sob diversas condições têm sido realizados. De acordo com o *Institute of Food Technologists* (IFT, 2001) *E. coli* O157:H7 pode se multiplicar, atingindo até 6 logUFC/g quando é inoculada em frutas e hortaliças, armazenadas a temperaturas superiores a 23°C em um período de 24h, inclusive havendo uma rápida multiplicação. Também tem sido demonstrada sua tolerância a ambientes ácidos, desenvolvendo-se normalmente em pH 4,0.

Outro ponto que deve ser ressaltado é sua capacidade de crescer em alface picada e pepino fatiado, acondicionados sob atmosfera modificada. O microrganismo cresceu nessas saladas armazenadas a 12°C e 21°C. Entretanto seu crescimento foi inibido em cenoura sob a mesma temperatura (ABDUL-RAOULF apud BEUCHAT, 1996a).

Esterco utilizado como fertilizante, assim como solo modificado ou água de irrigação representam uma fonte de contaminação potencial do patógeno para frutas e hortaliças. Estudos acerca da presença de *E. coli* O157:H7 em fezes bovinas revelou que o patógeno sobrevive em esterco de gado por 42 a 49 dias, a 37°C e 49 a 56 dias a 22°C. Além disso, Beuchat (1999a) detectou o microrganismo em alface contaminada com esterco incubada a 4°C por mais de 15 dias, inclusive quando a população inicial era de  $\leq 1$  logUFC/g.

A presença do microrganismo em abatedouros também já foi comprovada. Quando inoculada no conteúdo intestinal de ovelha e gado, a bactéria mostrou-se capaz de sobreviver a 5°C e aumentar sua população em 1-2 log entre 15 e 30°C em um período de 28h. Já no sangue dos mesmos animais, uma redução de 0 a 2 logUFC/ml pôde ser observada, de acordo com a temperatura de estocagem, exceto no sangue de ovelha estocado a 30°C, no qual a redução da população de *E. coli* O157:H7 foi seguida por um aumento de 3 log UFC/ml. Esse tipo de estudo ressalta a importância da eliminação de patógenos dos abatedouros, antes da utilização desse tipo de resíduo no solo onde frutas e vegetais serão plantados (HEPBURN, 2002).

Islam et. al. (2004a) monitoraram a presença de *E. coli* O157:H7 em folhas de alface e salsa, plantadas em campos com adubos compostados de aves domésticas e gado, e água de irrigação inoculada com 5-7 log UFC/ml do patógeno. A compostagem do solo e a irrigação do mesmo com água contaminada foi feita 1 dia antes e 3 semanas depois, respectivamente, do plantio das sementes de alface e salsa. O patógeno foi detectado no solo por 154-177 dias após a compostagem, e na alface e salsa 77 e 177 dias, respectivamente, após o plantio das sementes. O tipo de compostagem não afetou a sobrevivência do microrganismo.

Os estudos acima descritos reforçam a hipótese de que, uma vez que microrganismos patogênicos tenham acesso ao solo em que o vegetal será plantado ou à água de irrigação, sua transmissão para o produto é praticamente certa, e que as maiores fontes de contaminação são as fezes de animais utilizadas para adubar o solo.

Dados sobre a prevalência de *E. coli* O157:H7 em vegetais minimamente processados são raros na literatura, tanto nacional quanto internacional, sendo que a maioria dos trabalhos existentes relacionam-se com surtos provocados pelo patógeno ou mesmo o comportamento do microrganismo em condições pré-estabelecidas, com contaminação artificial das amostras estudadas.

Zepeda-Lopez et al. (1995) detectaram o patógeno em amostras de repolho (1/4), aipo (6/34), coentro (8/41) e brotos de diversos vegetais para o preparo de sanduíches (2/20) no México. Já Previti et al. (2002) encontraram duas amostras de saladas de vegetais mistos positivas para *E. coli* O157:H7 de um total de 112 produtos analisados.

Solomon et al. (2002) compararam o efeito do método de irrigação na persistência de *E. coli* O157:H7 em alfaces, e verificaram que o número de amostras positivas para a presença do microrganismo após a colheita (40 dias), submetidas à irrigação através de um spray de água contaminada com o patógeno foi maior (29 de 32 amostras) quando comparado a amostras submetidas à irrigação superficial (6 de 32 amostras).

Os mesmos autores realizaram um estudo com a contaminação artificial da água de irrigação de uma plantação de alfaces com  $10^2$  ou  $10^4$  UFC/ml de *E. coli* O157:H7 e, através de jatos de spray dessa água contaminada, irrigaram as alfaces, que foram analisadas durante 30 dias. Somente as amostras expostas à irrigação com  $10^2$  UFC/ml no dia 1 não carregaram o patógeno até o final do período de coleta de amostras. Todos os outros tratamentos resultaram na presença do microrganismo nas hortaliças no período de colheita, sendo que as alfaces irrigadas com  $10^4$  UFC/ml continham elevadas contagens da bactéria. Dessa forma, verifica-se que a aplicação de água contaminada diretamente sobre as folhas de hortaliças está diretamente relacionada com a presença do microrganismo no produto a ser colhido, podendo não só contaminar o solo onde outras sementes serão plantadas, como também ser a fonte de contaminação da linha de processamento e permanecer no produto final, dependendo das condições de manuseio desse vegetal.

No Brasil, Silva et al. (2003) analisaram 869 amostras de vegetais (alface, chicória e rúcula) quanto à presença de *E. coli* O157:H7, e não detectaram o microrganismo em nenhuma das amostras analisadas.

### **2.5.1.3. *Listeria monocytogenes***

Os vegetais e partes de vegetais utilizados no preparo de saladas são importantes na disseminação de patógenos, do seu hábitat natural para a cadeia alimentar humana. *Listeria monocytogenes* está amplamente distribuída na natureza, sendo uma bactéria ubíqua, desenvolvendo-se em condições que seriam adversas para outros microrganismos patogênicos (BEUCHAT, 1996; SWAMINATHAN, 2001).

A *Listeria* pode ser descrita morfológicamente como um bacilo pequeno, regular, Gram positivo, podendo se apresentar em unidades ou cadeias pequenas, não formadora de esporos. Apresenta motilidade característica a 25°C, com movimentos rotatórios ou de tombamento, em montagens úmidas observadas sob imersão, e imóvel a 35°C (RYSER & DONELLI, 2001). Produz catalase, mas não oxidase, é anaeróbia facultativa, fermenta glicose, com produção de ácido e sem formação de gás (ICMSF, 1996).

O pH de multiplicação varia entre 4,39 e 9,4, com ideal entre 6 e 8 sendo 7,0 pH ótimo. A temperatura ótima encontra-se entre 30° e 37°C, multiplicando-se, porém, entre -0,4°C e 45°. Por ser ácido-tolerante sobrevive em alimentos de baixa acidez por dias ou semanas. Pode se multiplicar em alimentos com atividade de água de 0,92 e também em meio de cultura contendo 10% de NaCl (ICMSF, 1996; DONELLY et al., 2001).

Existem seis espécies de *Listeria*, sendo *L. innocua*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e a *L. monocytogenes*, patogênica e mais importante das espécies relacionada a infecções transmitidas por alimentos (DSMZ, 2005 APUD

SILVA, 2007). São conhecidos 13 sorovares, mas somente 3 (4b, 1/2a e 1/2b) são responsáveis por 89 – 96% dos casos de listeriose humana (ICMSF, 1996)

Diversos são os alimentos que já foram envolvidos em surtos de listeriose, como por exemplo: leite, queijos, carne bovina, aves, frutos do mar, alimentos de origem vegetal e refeições prontas (CDC, 2006).

A dose infectante mínima para a contaminação ainda não foi estabelecida, porém informações sobre a população do patógeno encontrado em alimentos envolvidos em surtos indicam que entre  $10^3$  e  $10^4$  UFC/g foram responsáveis por causar doença (DUFFY et. al., 1999).

Estudos de análise de risco e dose-resposta estimaram que a quantidade de *L. monocytogenes* responsável por produzir infecção em 10% e 90% da população estudada ( $ID_{10}$  e  $ID_{90}$ ) estaria, respectivamente, entre  $10^7$  e  $10^9$  UFC, para indivíduos saudáveis, e  $10^5$  e  $10^7$  UFC para população de risco (FAO/WHO, 2004)

A ingestão de alimentos contaminados é particularmente perigosa para gestantes, indivíduos imunocomprometidos, portadores de HIV, cirrose, carcinoma dentre outras doenças que comprometam o sistema imune. Idosos e recém-nascidos também podem ser considerados como população de risco (KILLINGER, 1970 apud DONELLY, 2001)

Alguns trabalhos internacionais mostram resultados distintos quanto a presença de *L. monocytogenes* em vegetais minimamente processados. Em análise de 112 amostras de vegetais e saladas individuais ou mistas não foi detectada a presença do microrganismo (PREVIDI, 2002). Guerra et al. (2001) também não encontraram o patógeno em 37 amostras de frutas e hortaliças minimamente processadas em Portugal, assim como Farber et al. (1989), ao analisarem 110 amostras de vegetais “in-natura” no Canadá e também Pingulkar et al. (2001) na Índia, que examinaram 116 amostras de diversos vegetais.

Nos Estados Unidos, pepinos, figos da Índia, batatas e rabanetes estavam contaminados com o microrganismo. Já na Holanda foram encontradas 11

amostras de vegetais minimamente processados contaminadas, de um total de 25. Na Irlanda do Norte e Malásia, em sete de 66 amostras de vegetais para saladas e hortaliças frescas, respectivamente, foi detectada a presença do patógeno (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

Ao analisar 160 amostras de vegetais orgânicos minimamente processados, em Zâmbia, Nguz et al. (2005) encontraram *L. monocytogenes* em 20% dos produtos. Na Espanha, Soriano et al. (2001) verificaram que de 20 amostras de alface e espinafre minimamente processados houve detecção do patógeno em 10% das amostras de alface e não foi encontrado em espinafre.

Também foi detectado na Inglaterra, porém com baixa incidência, em 3% e 2,3% de um total de 2950 e 3852 amostras de vegetais minimamente processados, respectivamente, de acordo com Sagoo et al. (2003a e b). Em outra pesquisa, poucas amostras de alface, 2 a 5%, também foram detectadas como positivas para *L. monocytogenes*, de um total de 120 unidades amostrais (SZABO, 2000).

Estudo realizado no Brasil por Porto e Eiroa (2001) mostrou que das 250 amostras de diversas hortaliças analisadas, 3,2% (alface, salsa e agrião) estavam contaminadas com o patógeno.

Ao analisar 140 amostras de hortaliças minimamente processadas comercializadas em Belo Horizonte (MG) e Campinas (SP), Rosa (2002) não encontrou *L. monocytogenes* em nenhum dos produtos, porém 12,21% das amostras continham *L. innocua* sorovar 6a e 16,28% *L. innocua* não tipável.

Também no Brasil, Maistro (2006) realizou um trabalho comparando metodologias para análise de diferentes microrganismos em vegetais folhosos minimamente processados acondicionados sob atmosfera modificada ativa (n=72) e passiva (n=100). Na primeira condição detectou duas amostras positivas para *Listeria monocytogenes* (agrião e escarola), já na segunda não foram encontradas amostras positivas.

Na Venezuela, Curtis et al. (2002) analisaram 120 amostras de vegetais minimamente processados (alface americana, salada de repolho branco, roxo e cenoura e outra salada composta por alface, repolho roxo e cenoura) acondicionados em embalagens institucionais (1Kg) e encontraram *L. monocytogenes* em 9% dos produtos e *Listeria* sp. em 25%.

Trabalho realizado no Texas por Prazak et al. (2002) mostrou que de 855 amostras de salada de repolho, água e esponjas de limpeza de diversas etapas do processamento, coletadas em fazendas e galpões de armazenamento, 26 (3%) apresentaram *Listeria monocytogenes*. Dessas, 20 eram provenientes da salada de repolho, 3 de amostras de água e 3 das esponjas dos galpões.

Amostras de alface picada foram inoculadas artificialmente com *L. monocytogenes* antes e após a lavagem por 3 minutos em água a 4°C e 47°C, contendo 100mg/l de cloro total, e armazenadas a 1°C e 10°C em embalagens permeáveis ao oxigênio. A lavagem com água gelada (4°C) prejudicou a sobrevivência do microrganismo independente da temperatura de armazenamento. Entretanto, a lavagem com água clorada aquecida favoreceu o crescimento microbiano das amostras estocadas a 10°C (DELAQUIS et al, 2002). Este trabalho reafirma que condições de abuso de temperatura permitem que um patógeno presente possa se multiplicar no alimento pronto para o consumo, oferecendo grandes riscos à saúde da população, especialmente mulheres grávidas e indivíduos imunodeprimidos, no caso da *Listeria*.

As plantas e suas porções comestíveis podem conter o microrganismo aderido à sua superfície devido à formação de biofilmes, o que permite a contaminação do ambiente industrial, equipamentos, contêineres, locais de armazenamento, entre outros (BEUCHAT, 1996a e b)

*L. monocytogenes* pode se multiplicar em produtos armazenados sob refrigeração, tais como aspargos, brócolis e couve-flor armazenados a 4°C, alface a 5°C e chicória a 6,5°C. O armazenamento em embalagens com atmosfera modificada parece não influenciar o desenvolvimento microbiano (BEUCHAT, 1996).

Certas hortaliças podem conter inibidores naturais contra o patógeno. O suco de cenoura parece impedir o crescimento desse microrganismo devido a presença de fitoalexinas, presentes na forma natural na cenoura. Essa substância, porém, desaparece caso o vegetal seja cozido (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

#### **2.5.1.4. *Salmonella***

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (POPOFF & LE MINOR, 2005), *Salmonella* é classificada como um bastonete Gram negativo, anaeróbio facultativo, não esporulado, oxidase negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, tribo *Salmonelleae* estando, portanto, estritamente relacionada com a *E. coli*. Podem ser diferenciadas de outras bactérias do mesmo gênero através de provas bioquímicas, meios diferenciais e sorologia. Apresenta motilidade através de flagelos peritríqueos, porém os sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* são imóveis.

O gênero é composto por mais de 2700 sorovares, sendo que animais e pássaros são os reservatórios naturais. Porém estudos analisando produtos frescos revelaram a presença de diversos sorotipos de *Salmonella* capazes de causar infecções em humanos (BEUCHAT, 1996).

Podem desenvolver-se em temperaturas entre 5,2 e 46,2°C, sendo 35°C a 43°C a temperatura ótima. A multiplicação a baixas temperaturas ocorre lentamente, e nem todos os sorovares possuem essa habilidade. Existem diferenças quanto a resistência ao calor, dependendo do pH, sendo que alguns sorovares suportam melhor temperaturas mais altas em pH 5,5 do que em pH 8,5. A partir de 74°C obtém-se rapidamente a eliminação do patógeno dos alimentos com alta atividade de água. Em baixas temperaturas foi observado que a sobrevivência da *Salmonella* é mais efetiva a -23°C do que entre -2°C e -5°C (ICMSF, 1996).

Esse dado também foi confirmado por González-Aguilar et al. (2005) que relatam que, apesar da *Salmonella* não se multiplicar em temperaturas de congelamento, como por exemplo -20°C por até 1 mês, sua população também não diminui.

O valor ótimo de pH para a multiplicação varia entre 7,0 e 7,5, mas verifica-se crescimento entre 3,8 e 9,5. O valor mínimo de atividade de água para desenvolvimento é de 0,94. A presença de até 4% de NaCl e 0,035% de nitrato nos alimentos não é capaz de inibir a multiplicação de alguns sorovares (ICMSF, 1996).

*Salmonella* está distribuída abundantemente em material fecal, nos esgotos e águas poluídas que, conseqüentemente, contaminam o solo que entra em contato com essa matéria orgânica. Se esse material for utilizado na agricultura irá disseminar a bactéria que, uma vez introduzida no ambiente, permanece viável por meses, possibilitando a ocorrência de infecções alimentares em indivíduos que consumirem o alimento contaminado (FRANCIS et al., 1999; BEUCHAT, 2006).

Mammina et al (2002) realizaram um trabalho na Itália, mostrando o isolamento de 345 espécies de *Salmonella* no esgoto de efluente de plantas. Cerca de 44% correspondiam a *S. Enteritidis* e 14% eram resistentes a três ou mais antibióticos.

A persistência de *S. Typhimurium* no solo também foi avaliada. Após a inoculação do patógeno no solo contendo esterco compostado de aves domésticas, gado e água de irrigação observou-se que o patógeno permanecia viável por 203 a 231 dias, sendo que o melhor meio para a sobrevivência foi o esterco de aves domésticas. Radichos e cenouras plantados nesse solo abrigaram o microrganismo por 84 e 203 dias, respectivamente, após o plantio da semente (ISLAM et al., 2004).

Castillo et. al. (2004) analisaram amostras de ambiente, água de irrigação e melões de fazendas nos Estados Unidos e México e detectaram *Salmonella* em 31 de 1735 amostras analisadas. Esse estudo mostra como a água de irrigação e o

ambiente possuem um papel importante na disseminação de microrganismos patogênicos para produtos de origem vegetal.

Uma vez ingerido, o microrganismo começa a provocar sintomatologia em um período de 18 a 72h. Os sintomas característicos são dor abdominal, diarreia, calafrios, febre, náusea e vômito. A dose infectante varia entre  $10$  a  $10^6$  células viáveis (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

Esse patógeno está associado, naturalmente, ao corpo de diversos animais, tendo sido isolado de mamíferos, aves domésticas, pássaros, gado, répteis, peixes, anfíbios e insetos. O alimento pode ser considerado o vetor de transmissão de *Salmonella* para humanos, especialmente alimentos de origem animal e também aqueles que tiveram contato com esgoto e/ou água contaminados (FRANCIS et al., 1999).

Os alimentos comumente implicados na transmissão de doenças de origem alimentar por tal patógeno são carne, ovos e aves, porém o aumento do número de notificações mostra que tanto frutas quanto hortaliças também são importantes fontes de *Salmonella*. Tal microrganismo é responsável pela maioria dos casos de gastroenterite provocados por alimentos, e os vegetais minimamente processados estão incluídos nessa lista (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

No ano de 2000, 174 e 140 indivíduos foram acometidos por salmonelose após a ingestão de alface, na Inglaterra e País de Gales, respectivamente (PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE – PHLS, 2000 apud SAGOO, 2003a). Já em 2006, 180 pessoas, após o consumo de tomates em um restaurante, adquiriram salmonelose nos Estados Unidos (CDC, 2006).

A *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* (ICMSF) e o *Codex Alimentarius* classificam *Salmonella* como perigo de categoria 2, ou seja, risco direto à saúde, de difusão limitada apenas às pessoas que ingeriram o alimento ou água contaminados (KUSHIDA, 2005).

A legislação brasileira segue as normas internacionais, sendo rigorosa neste sentido, ou seja, não há tolerância em relação à presença da bactéria em

alimentos. Para as análises, recomenda-se um plano de amostragem de 2 classes, estabelecendo ausência de *Salmonella* em 25g de cada unidade de amostra (BRASIL, 2001).

O microrganismo já foi detectado em feijão, alface, cebola, alface, sendo que na maior parte dos surtos envolvendo vegetais houve uma associação com o consumo de alface e saladas verdes. Dentre as frutas já envolvidas estão a laranja e diferentes tipos de melão (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

Estudo realizado por Guo et al. (2002) analisou a infiltração de *Salmonella* em tomates, quando colocados em contato com a superfície de solo inoculado com 8 log UFC/g do microrganismo durante 14 dias a 20°C. Pôde-se verificar que após 45 dias a contagem era de 6,7 logUFC/g, indicando grande viabilidade e retenção microbiana no produto. Nos estágios iniciais de armazenamento, a população microbiana no pedúnculo e áreas superficiais aumentou com o aumento do tempo de estocagem.

Dessa forma, é de extrema importância a aplicação das boas práticas agrícolas no início da cadeia produtiva de alimentos de origem vegetal, uma vez que o solo esteja contaminado, ou mesmo a água de irrigação, existem grandes chances do microrganismo permanecer no produto até o momento do processamento. E se as boas práticas de fabricação não forem aplicadas, o patógeno possui condições de permanecer no produto final, como mostram alguns trabalhos a seguir.

Fröder (2005) encontrou quatro amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas (escarola, agrião, alface mimosa e salada composta de: beterraba, almeirão, alface, cenoura e repolho) positivas para *Salmonella*, de um total de 133 analisadas.

Rosa (2002) detectou o microrganismo em 11 das 140 amostras analisadas, sendo essas almeirão e vegetais para o preparo de *tepanyaki*. Maistro (2006) encontrou uma amostra de agrião acondicionado sob atmosfera modificada ativa positiva para *Salmonella*, de um total de 72 produtos analisados.

Trabalho realizado por Pinheiro et al. (2005) analisando a microbiota de frutas minimamente processadas encontrou uma elevada contaminação por *Salmonella* em 25% de um total de 100 amostras, e dentre as contaminadas encontravam-se mamão, melão, abacaxi, goiaba e manga. O mamão foi a fruta que apresentou mais amostras positivas para o patógeno (n=10).

Barreto et al. (2003) encontraram *Salmonella spp* em 1,4% das 70 amostras de hortaliças folhosas consumidas "in-natura" analisadas.

Na tabela 2 podem ser observados outros vegetais associados à presença de *Salmonella*.

**Tabela 2.** Prevalência de *Salmonella* em vegetais minimamente processados

| Produto         | País          | Prevalência | Referência                   |
|-----------------|---------------|-------------|------------------------------|
| Alcachofra      | Espanha       | 3/25        | Garcia-Villanova Ruiz et al. |
| Broto de feijão | Suíça         | ?           | Anderson et al.              |
| Beterraba       | Espanha       | 4/52        | Garcia-Villanova Ruiz et al. |
| Repolho         | Espanha       | 7/41        | Garcia-Villanova Ruiz et al. |
| Couve-flor      | Países Baixos | 1/13        | Tamminga et al.              |
|                 | Países Baixos | 1/23        | Garcia-Villanova Ruiz et al. |
| Pimenta         | Espanha       | 2/26        | Garcia-Villanova Ruiz et al. |
| Coentro         | Suriname      | 5/16        | Tamminga et al.              |
| Endívia         | Países Baixos | 2/13        | Tamminga et al.              |
| Cebola          | Itália        | 4/89        | Tamminga et al.              |
| Alface          | Itália        | 83/120      | Ercolani                     |
|                 | Países Baixos | 2/28        | Tamminga et al.              |
|                 | Espanha       | 5/80        | Garcia-Villanova Ruiz et al. |
| Salsa           | Espanha       | 1/23        | Garcia-Villanova Ruiz et al. |
| Pimentão        | Suíça         | ?           | Anderson et al.              |
| Espinafre       | Espanha       | 2/38        | Garcia-Villanova Ruiz et al. |
| Vegetais        | Egito         | 2/250       | Satchell et al.              |
|                 | Iraque        | 3/43        | Al-Hindawi & Rished          |
|                 | Espanha       | 46/849      | Garcia-Villanova Ruiz et al. |
|                 | EUA           | 4/50        | Rude et al.                  |

Fonte: Beuchat, 2002

Os vegetais pré-cortados apresentam uma maior superfície de contato para que os microrganismos fiquem aderidos, permitindo portanto que altas concentrações microbianas estejam presentes no alimento. Estudos com pepinos inteiros e cortados mostraram que a aderência de *Salmonella*, antes e após a realização de duas lavagens com fosfato trissódico, era muito maior no vegetal cortado do que no inteiro (GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005).

Dados internacionais também apontam para a presença e permanência de *Salmonella* em inúmeros vegetais minimamente processados, tanto nos produtos adquiridos nos pontos de venda final e diretamente analisados, quanto àqueles inoculados artificialmente com diversas concentrações do microrganismo e submetidos a tratamento químico posterior.

Sagoo et al. (2003a e b) realizaram dois estudos no Reino Unido, onde analisou a qualidade microbiológica de 2950 e 3852 amostras de saladas de vegetais prontos para o consumo pré-abertos (provenientes de restaurantes, bares, cafés, hotéis, lojas de conveniência, entre outros) e prontos para o consumo, respectivamente, encontrando *Salmonella* apenas no segundo estudo, onde 5 amostras de alface continham o patógeno.

Outros autores também relatam a prevalência do microrganismo em diversos vegetais minimamente processados, tais como broto de feijão (30/344) na Tailândia (JERNGLINCHAN apud BEUCHAT, 1996a), saladas verdes (2/250) no Egito (SACHEL et. al., 1990), semente de alfafa (TAORMINA et al., 1999; AABO, 1997 apud BEUCHAT, 2002) e broto de alfafa (MOUZIN, 1997 apud BEUCHAT, 2002) nos Estados Unidos.

A contaminação dos alimentos pelos manipuladores é a principal causa das toxinfecções alimentares. Embora possam não apresentar sintomas da doença, eles podem eliminar os patógenos pelas fezes, pele, saliva, entre outros, comprometendo a qualidade e segurança do alimento devido a precários hábitos de higiene pessoal. Saladas cruas, por exemplo, podem ser manipuladas por portadores assintomáticos de *Salmonella* Typhi ou *Salmonella* Enteritidis, responsáveis pela febre tifóide e entérica, respectivamente (SILVA JR., 2002).

### 2.5.2. Fontes de contaminação

Os utensílios e equipamentos utilizados para o processamento podem representar potenciais fontes de contaminação pois normalmente possuem partes de difícil higienização onde haverá o alojamento de microrganismos.

Superfícies irregulares nos equipamentos também permitem a infiltração microbiana, fornecendo condições para o desenvolvimento de microrganismos (PILON, 2003).

O excesso de umidade e o exsudado liberado nas superfícies do corte dos tecidos e nos utensílios e equipamentos proporcionam o rápido crescimento microbiano. Sendo assim, durante o corte do produto pode haver um aumento significativo do número de bactérias presentes, podendo ser de 6 a 7 vezes em relação à população microbiana inicial (PILON, 2003).

Durante o preparo dos produtos prontos para o consumo, os vegetais inteiros são lavados, normalmente com água contendo entre 50 e 200ppm de cloro, e depois cortados e embalados. Enquanto a lavagem é responsável por reduzir o número de microrganismos, a operação de corte representa um recontaminante potencial do alimento (JAY, 2005).

No Brasil, o reconhecimento oficial da poluição fecal de hortaliças, especialmente alfaces, data de 1945, quando alguns pesquisadores encontraram *Escherichia coli* em 29,3% de 252 amostras de diversas hortaliças pesquisadas. Em 1958, Christóvão demonstrou a existência desse problema em alfaces comercializadas no Estado de São Paulo. No final da década de 70, o problema já estava instalado nesse Estado, uma vez que estudos apontaram alta contaminação fecal em 54% das amostras de hortaliças analisadas, especialmente alfaces.(GELLI et al., 1979).

Muito se tem pesquisado em vários países com relação à contaminação de frutas e hortaliças, e surtos de toxinfecções alimentares associados a esses

produtos continuam a existir, apesar dos avanços tecnológicos (BEUCHAT, 1999). Atualmente, produtos como tomates, alface, salsinha, couve, suco de laranja, suco de maçã, são os hortifrutículas mais incriminados em surtos DTAs em nível mundial (SHARMA et al., 2002).

Entre as hortaliças mais vendidas para consumo cru está a alface (*Lactuca sativa*) e os vegetais folhosos em geral, bastante utilizados na confecção de sanduíches, decorações de pratos, saladas, etc., além do produto pronto para consumo, na forma de hortaliça minimamente processada.

Em uma pesquisa realizada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) (SILVEIRA et al. 2003), 8 empresas paulistas fabricantes de vegetais minimamente processados foram visitadas, nas regiões de Campinas e Sorocaba. Em apenas duas os funcionários utilizavam máscaras e luvas durante o processamento. As condições gerais de limpeza, conservação e instalações (pé direito, revestimento das paredes, piso, iluminação, ventilação, forro, aberturas no prédio, instalações elétricas, hidráulicas e sanitárias) não eram adequadas em 6 dessas empresas. A pesquisa revelou ainda que a grande parte dos vegetais minimamente processados são consumidos crus (saladas) e que os consumidores acreditam que estejam higienizados e sejam seguros. Essa é uma questão bastante séria, porque aumenta o risco de veiculação de bactérias patogênicas

Existe uma variedade de métodos que podem ser utilizados visando a redução da população microbiana tanto em produtos vegetais frescos quanto minimamente processados, sendo que cada um deles possui vantagens e desvantagens, dependendo do tipo de produto, protocolo de utilização e outras variáveis (PARISH et al., 2003).

O melhor, entretanto, para eliminar patógenos dos produtos é, primeiramente, prevenir a contaminação. Porém, como isso não é sempre possível, a lavagem e sanitização de diversos vegetais minimamente processados tornam-se fundamentais na prevenção da ocorrência de surtos de origem alimentar. Porém, vale salientar que essas práticas não são capazes de eliminar

totalmente microrganismos patogênicos do alimento quando este se encontra contaminado (PARISH et al., 2003).

Outro ponto importante é que algumas frutas que possuem uma estrutura bastante delicada, como amoras e framboesas, não podem ser lavadas, ou esse procedimento deve ser executado de forma branda visando manter as suas características físicas. A lavagem também pode acarretar uma proliferação fúngica nesse tipo de produto (PARISH et al., 2003).

### **3. OBJETIVO**

Verificar as condições microbiológicas, tanto em relação à presença de patógenos quanto ao perfil higiênico-sanitário, de amostras de frutas e hortaliças minimamente processadas coletadas nos pontos de venda final da cidade de Campinas - SP.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Amostragem**

Foram analisadas 180 amostras de hortaliças e frutas minimamente processadas (33 amostras de alface; 5 de almeirão; 3 de agrião; 2 de acelga; 5 de chicória; 17 de couve picada; 10 de rúcula; 10 de repolho; 20 de cenoura; 5 de beterraba ralada; 5 de abobrinha; 40 de saladas mistas; 5 de polpa de maracujá; 10 de melão; 5 de mamão e 5 de abacaxi) , adquiridas nos pontos de venda final, tanto em supermercados quanto em varejões e feiras livres da cidade de Campinas – SP. A aquisição dos produtos priorizou os itens preferencialmente consumidos crus e também os de maior consumo.

O critério adotado para a escolha do plano de amostragem seguiu o disposto na RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL), que descreve a coleta de unidades aleatórias (n=5) de um mesmo lote e análises individuais para cada unidade, totalizando 36 lotes. As amostras adquiridas foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do ITAL e analisadas no dia de sua aquisição ou na manhã seguinte, sendo mantidas sob temperatura de refrigeração (5°C a 8°C) até o momento da análise, simulando, assim, as mesmas condições que estariam, ou deveriam estar, no ponto de venda final.

### **4.2. Preparo das amostras para análise**

As embalagens dos produtos amostrados foram sanitizadas com algodão embebido em álcool 70% e, em seguida, abertas assepticamente em cabine de fluxo laminar. Quatro unidades analíticas de 25g de cada amostra foram pesadas, em balança calibrada pela Rede Brasileira de Calibração (RBC), previamente

tarada, sendo transferidas para bolsas estéreis para a realização das análises microbiológicas

### **4.3. Análises microbiológicas**

As determinações de *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, coliformes totais e fecais (*E. coli*), foram realizadas de acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e as contagens de aeróbios mesófilos totais e bolores e leveduras foram realizadas segundo a metodologia da *American Public Health Association* (APHA), descritas no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES & ITO, 2001).

Para os microrganismos patogênicos (*Salmonella*, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7) foi utilizado o Sistema Bax<sup>®</sup> de análise por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) da Dupont/Qualicom, sendo seguida a metodologia especificada pelo fabricante. Para a contagem de coliformes totais e *E. coli* utilizou-se o Petrifilm EC<sup>®</sup> da 3M Company. Finalmente para as contagens de aeróbios mesófilos totais e bolores e leveduras foram utilizados o Agar Padrão para Contagem (PCA) e o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), respectivamente.

#### **4.3.1. Sistema BAX<sup>®</sup>**

O sistema automatizado Bax<sup>®</sup> de análise por PCR permite detecção rápida e sensível de alguns microrganismos patogênicos, sendo que sua especificidade baseia-se na utilização de iniciadores que amplificam especificamente seqüências alvo do DNA do microrganismo que está sendo determinado.

Descrevendo brevemente a técnica, dois “primers” específicos (pequenos fragmentos da fita simples de DNA, em direções opostas) flanqueiam a seqüência de DNA a ser amplificada e, pela ação da enzima DNA polimerase, sintetizam uma cópia da região delimitada por eles (FRÖDER, 2005).

A reação envolve 3 etapas básicas, descritas a seguir:

- 1ª - Aquecimento da amostra a 90-95°C por alguns segundos, para a separação das fitas de DNA;
- 2ª - Resfriamento a 55°C para anelamento ou hibridização dos primers às regiões complementares do DNA molde;
- 3ª - elevação da temperatura para 75°C para a síntese de DNA por meio de nucleotídeos por ação da Taq DNA polimerase, ou seja, extensão e síntese do fragmento de DNA.

Este ciclo é repetido por 38 vezes, sendo que cada novo fragmento sintetizado serve como molde para os ciclos subseqüentes, resultando em um aumento exponencial do número de cópias da região do DNA alvo (FARBER, 1996).

Quando ocorre a amplificação, o corante SYBR GREEN® emite um sinal fluorescente na presença do DNA, que é detectado por lâmpadas de diodo, dispostas para cada tubo de amostra analisada (capacidade para 96 amostras). Esta excitação fluorescente é captada e registrada pelo software. No caso da ausência do microrganismo alvo (de seu DNA) não ocorrerá emissão do sinal fluorescente.

#### **4.3.2. Determinação de *Salmonella* sp.**

Na etapa inicial, denominada pré-enriquecimento, 25g de amostra foram homogeneizadas com 225ml de Caldo Lactosado (Difco®) e incubados a 35°C / 24h. Em seguida 10 µl da amostra foram transferidos para microtubos (tubos de Ependorf) que continham 500 µl de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), e

incubados a 35°C / 3h. Após essa etapa de enriquecimento, 5 µl do BHI foram transferidos para microtubos contendo 200 µl de reagente de lise, ou tampão de lise. Posteriormente, os microtubos foram dispostos em 2 blocos aquecedores e 1 bloco resfriador, a 37°C ± 2°C por 20 minutos, 95°C ± 2°C por 10 minutos e 8°C por 5 minutos, respectivamente, como mostra a figura 2.

Os blocos aquecedores são responsáveis pelo rompimento da parede celular microbiana a fim de liberar o seu DNA, fragmento alvo do experimento, e o bloco resfriador possui a função de interromper a lise celular, quando o material necessário já se encontra disponível, evitando assim a lise do próprio DNA.

Vale ressaltar que a temperatura do primeiro bloco aquecedor varia de acordo com a espessura da parede microbiana, ou seja, bactérias Gram +, que possuem uma camada de peptidoglicano mais espessa, como a *L. monocytogenes*, devem permanecer no bloco a 55°C por 60 minutos. Já as bactérias Gram - como a *Salmonella* e *E. coli*, cuja camada de peptidoglicano é mais fina, permanecem apenas 20 minutos a 37°C.

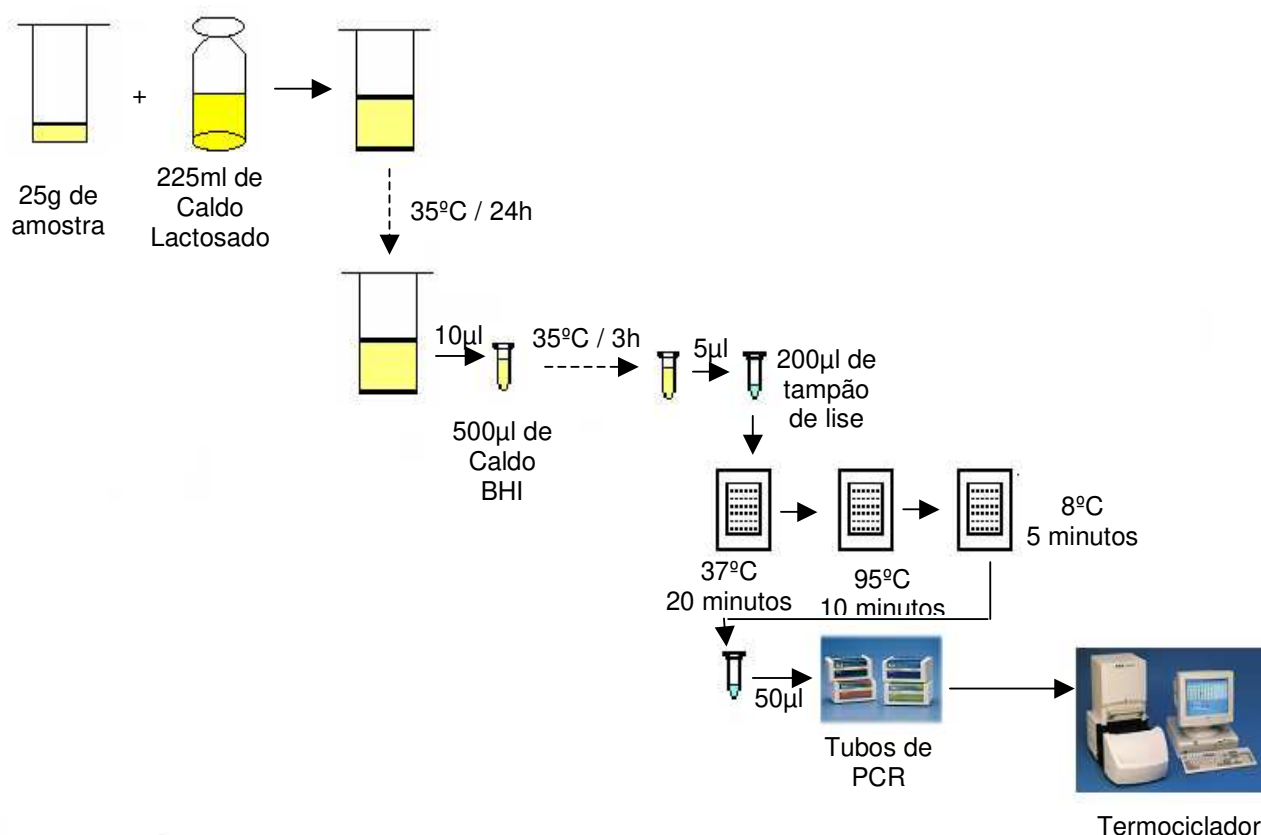
Após a liberação do DNA nos tubos de lise, as amostras, quando necessário, podem ser armazenadas sob refrigeração por até 72h e, posteriormente analisadas.

#### 4.3.2.1. Análise do DNA

A partir dos tubos de lise contendo os fragmentos de DNA livres, 50 µl foram transferidos para tubos de PCR, que contêm os reagentes necessários para a reação em cadeia de polimerase, como primers específicos, dNtps, Taq polimerase, corante fluorescente, padrão interno de controle, entre outros.

Em seguida os tubos foram colocados no equipamento (termociclador / detector) onde ocorreu a reação de PCR. Ao final de 38 ciclos de amplificação e detecção, com duração aproximada de 3h, um computador acoplado ao equipamento exibiu os resultados da análise. Amostras positivas foram

identificadas como círculos vermelhos contendo um sinal de “+” e as negativas como círculos verdes contendo um sinal de “-” no seu interior.

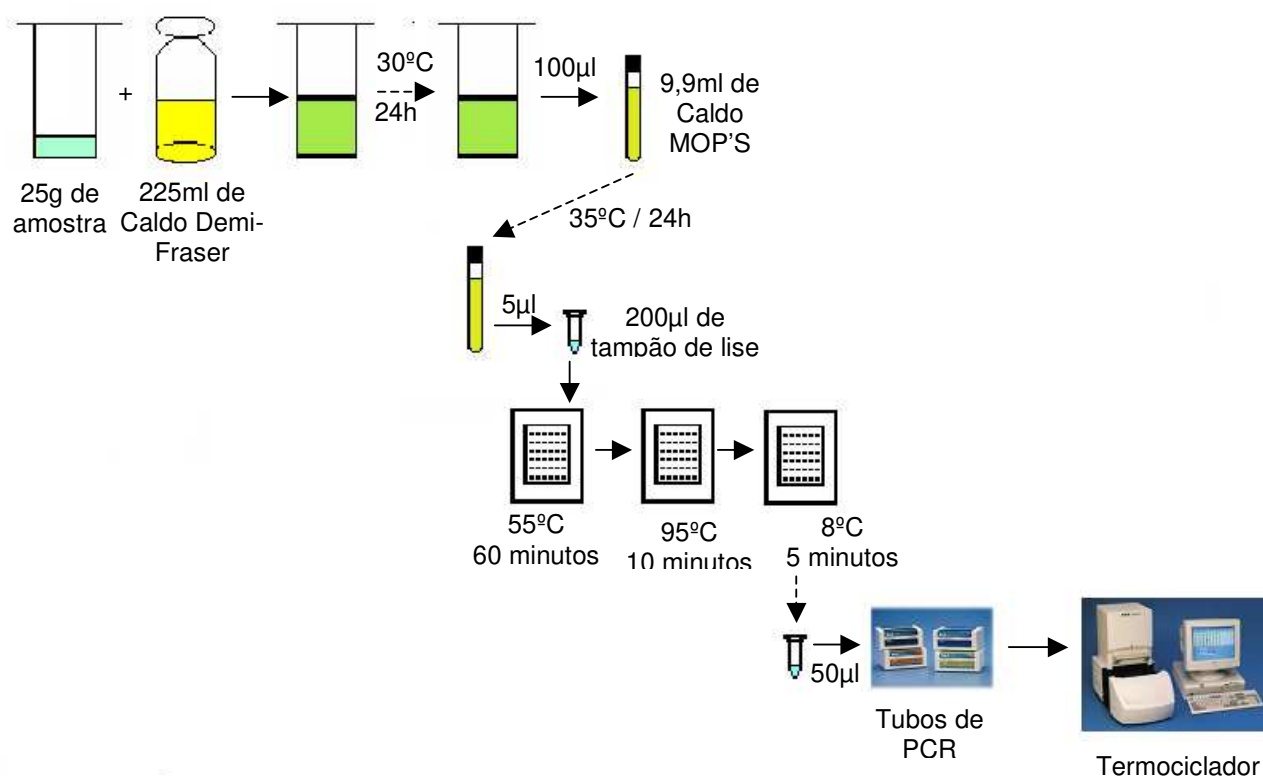


**Figura 2. Fluxograma esquemático da determinação de *Salmonella* através do Bax System®**

#### 4.3.3. Determinação de *Listeria monocytogenes*

Numa primeira etapa, denominada enriquecimento primário, 25g de amostra foram homogeneizadas com 225ml de Caldo Demi-Fraser (Difco®) e incubadas a 30°C / 24h. Em seguida, 100 µl da amostra enriquecida foram transferidos para tubos contendo 9,9ml de Caldo MOPS-BLEB (3-N-Morpholino propanesulfonic acid – buffered *Listeria* enrichment broth) e incubados a 35°C / 24h. Após esse enriquecimento secundário, 5 µl de caldo MOPS-BLEB foram transferidos para microtubos contendo 200 µl de tampão ou reagente de lise, que foram dispostos em 2 blocos aquecedores e 1 resfriador, a 55°C por 60 minutos, a

95°C por 10 minutos e a 8°C por 5 minutos. Com a partícula de DNA livre nos microtubos de lise, foram realizados os mesmos procedimentos descritos no item 4.3.2.1. A figura 3 mostra o fluxograma de análise do referido patógeno.

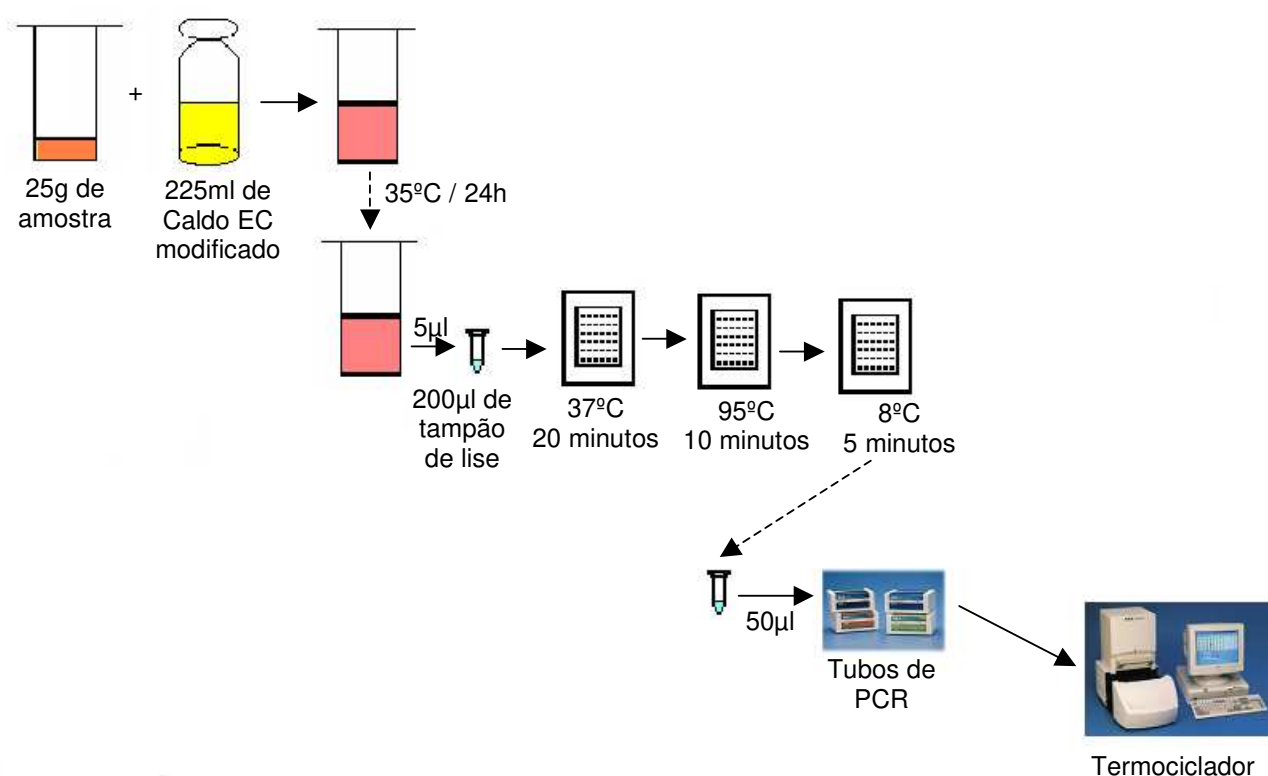


**Figura 3. Fluxograma esquemático da determinação de *L. monocytogenes* através do Bax System®**

#### 4.3.4. Determinação de *E. coli* O157:H7

Em uma primeira etapa, 25g de amostra foram homogeneizadas com 225ml de Caldo *E. coli* modificado com novobiocina (E.C modificado) e incubadas em “shaker” por agitação (Incubadora Marconi®) com temperatura controlada de 35°C durante 8h. A seguir, a amostra foi transferida para uma estufa estática, sob a mesma temperatura, permanecendo 16h adicionais, completando, portanto, 24h de incubação. Posteriormente, 5 µl da amostra enriquecida foram transferidos para microtubos contendo 200 µl de reagente ou tampão de lise, dispostos em seguida

nos 2 blocos aquecedores e 1 bloco resfriador, cujas temperaturas foram as mesmas utilizadas para a *Salmonella*, descritas em 4.3.2. Em seguida realizou-se o descrito no item 4.3.2.1. A figura 4 mostra o fluxograma esquemático e análise do referido patógeno.



**Figura 4. Fluxograma esquemático da determinação de *E. coli* O157:H7 através do Bax System®**

#### **4.3.5. Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais, bolores e leveduras, coliformes totais e *E. coli***

A quarta porção de 25g de amostra em bolsa plástica estéril foi utilizada para as contagens de aeróbios mesófilos totais, bolores e leveduras, coliformes totais e *E. coli*, sendo inicialmente homogeneizadas com 225ml de água peptonada e em seguida diluída em série decimal até  $10^{-6}$ , através de

transferências sucessivas de 1 ml da diluição anterior para tubos contendo 9ml de água peptonada.

#### **4.3.5.1. Contagem de microrganismos Aeróbios mesófilos totais – Semeadura em profundidade**

De cada diluição da amostra foi transferido 1 ml para placas de Petri estéreis descartáveis. Em seguida foram vertidos nas placas cerca de 20ml de Agar Padrão para Contagem (PCA), previamente estéril, fundido e resfriado a 45°C. O conteúdo das placas foi homogeneizado e após a completa solidificação do ágar, as placas foram incubadas a 35°C durante 48h. Decorrido o período de incubação, as placas que apresentavam entre 25 e 250 colônias foram contadas, com o auxílio de um contador de colônias, sendo calculado o resultado em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g), de acordo com Silva et al. (2001).

#### **4.3.5.2. Contagem de bolores e leveduras – Semeadura em Superfície**

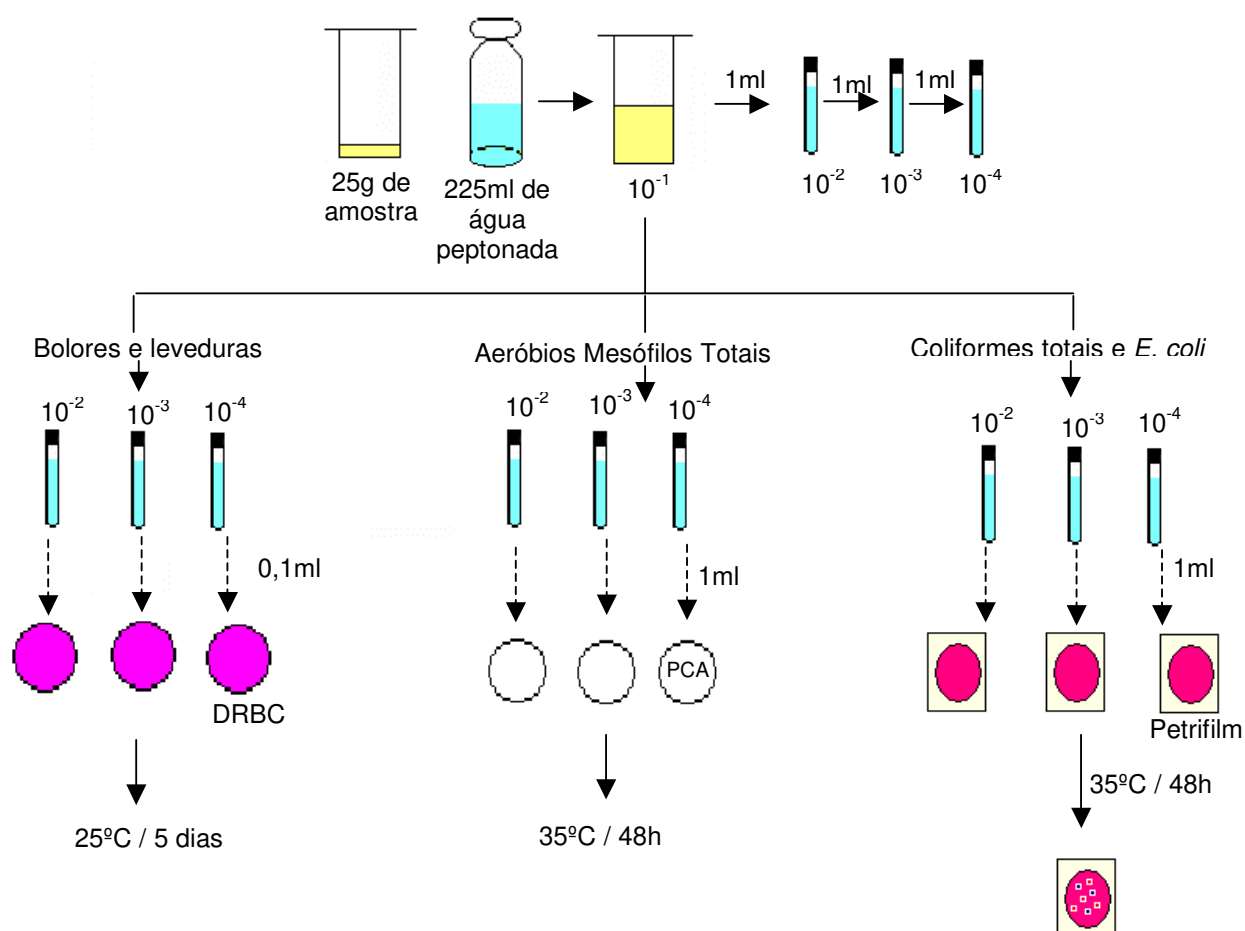
A partir das diluições da amostra descritas em 4.3.5., 0,1 ml foi transferido para placas contendo o meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), específico para a análise de alimentos com atividade de água superior a 0,96. Com o auxílio de uma alça de Drigalsky, o inóculo foi espalhado por toda a superfície do ágar até que o excesso de líquido fosse absorvido. Em seguida, as placas foram incubadas a 25°C durante 5 dias. A contagem das placas foi realizada mediante a seleção daquelas contendo entre 10 e 150 colônias, com o auxílio de um contador de colônias e em seguida foi calculado o resultado em UFC/g, de acordo com Silva et al (2001).

#### 4.3.5.3. Contagem de coliformes totais e fecais (*E. coli*) – Petrifilm EC®

A partir da mesma série de diluições decimais descrita no item 4.3.5., 1 ml de cada diluição foi transferido para Petrifilm EC® posicionado em superfície plana com o filme superior transparente levantado. O volume de 1 ml de cada diluição foi inoculado no centro do filme inferior, sobre o meio de cultura, sendo então coberto pelo filme superior, evitando a formação de bolhas. Um difusor plástico foi posicionado sobre o centro do filme superior. Com leve pressão, o líquido foi distribuído até a marca do difusor, no filme inferior. Os filmes foram incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante  $48\text{h} \pm 2\text{h}$ , não invertidos, e em pilhas de não mais do que 20 unidades. Foram selecionadas as diluições contendo de 15 a 150 colônias, tendo sido contadas as colônias típicas: coliformes totais – todas as colônias vermelhas, azuis ou vermelho-azuladas, com bolhas de gás, e coliformes fecais (*E. coli*) – todas as colônias azuis ou vermelho-azuladas com bolhas de gás.

De acordo com instruções do fabricante, as contagens podem ser realizadas após 24h de incubação, desde que os filmes sejam reincubados por 24h adicionais para a leitura final, totalizando 48h de incubação.

O fluxograma esquemático das análises destes microrganismos indicadores encontra-se na Figura 5.



**Figura 5. Fluxograma das contagens de bolores e leveduras, microrganismos aeróbios mesófilos totais, coliformes totais e fecais (*Escherichia coli*)**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas 180 amostras de vegetais minimamente processados analisados, não foi detectada presença dos patógenos *Salmonella*, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 através da técnica de PCR após enriquecimento da amostra, conforme preconizado pelo manual de instruções do Sistema Bax® da Dupont / Qualicon.

Em relação à qualidade higiênico-sanitária, 52 amostras (51 de hortaliças e 1 de fruta) apresentaram-se em desacordo com os limites máximos estabelecidos pela RDC nº 12 (BRASIL, 2001) para *E. coli* (2 e 2,69 logUFC/g, respectivamente). Das 155 amostras de hortaliças e 25 amostras de frutas prontas para o consumo analisadas, 87,74% e 60%, respectivamente, apresentaram contagem de microrganismos aeróbios mesófilos acima da especificação sugerida (6 logUFC/g), assim como 58,06% e 68% para bolores e leveduras (4 logUFC/g) e 45,6% e 30% para coliformes totais (6 logUFC/g).

### 5.1. Determinação de bactérias patogênicas em vegetais minimamente processados

Na análise de produtos com curto prazo de validade, como os vegetais minimamente processados, quanto mais rápido for obtido o resultado da análise microbiológica, mais efetiva será a liberação do lote para comercialização e mais eficiente será a rastreabilidade da amostra, caso o produto esteja envolvido em doenças de origem alimentar.

A escolha da utilização do sistema Bax® para a análise dos patógenos baseou-se, além da rapidez de obtenção dos resultados, na existência de diversos trabalhos comparando sua eficiência e sensibilidade com as do método

tradicionalmente utilizado na rotina de análises microbiológicas (STEWART, 2002; SILBERNAGEL, 2003; KUSHIDA, 2005).

Em 2002, o Sistema Bax® para análise de *Salmonella* foi validado pela AOAC (Performance Tested Method 100201) para análise de alimentos em geral. De acordo com esta Associação, os resultados da análise por PCR equipararam-se àqueles obtidos pelo emprego de métodos de referência padrão. Nessa validação, foram testados 20 tipos de alimentos, analisados simultaneamente pelo Bax® e métodos tradicionais oficiais, descritos pelo *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) e *United States Departamento of Agriculture / Food Safety and Inspection Service* (USDA/FSIS). De 775 amostras analisadas, 523 foram positivas por ambos os métodos, sendo que a taxa de falsos positivos foi 1,6%, falsos negativos 1,3% e precisão 99,4%. A sensibilidade do método em teste foi de 98,7% e a especificidade de 98,3% (AOAC, 2002).

Para a confecção do primer de *Salmonella* pela Dupont Qualicon, foi utilizada como base uma coleção de 1572 cepas ribotipadas da bactéria, de modo que um fragmento específico desse microrganismo fosse utilizado. O fragmento, exclusivo desse patógeno, é estável e não afetado pelo ambiente (HEALTH CANADA, 2003)

No Brasil, em 2004, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) conduziu um teste interlaboratorial, no qual 4 laboratórios analisaram 1879 amostras de diferentes alimentos. Os resultados mostraram que o método teste obteve 98,1% de sensibilidade, 98,5% de especificidade, 1,9% de falsos negativos e 1,5% de falsos positivos em relação ao método de referência. Dessa forma, o método Bax® para análise de *Salmonella* em alimentos foi oficializado em âmbito nacional (BRASIL, 2004).

As análises de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 também foram validadas pela AOAC (AOAC 2003.12 e AOAC 010401, respectivamente), através do “*Performance Tested Method*” e pelo *Health Canadá*, para a análise de alimentos em geral. Recentemente, no final de 2006, o *Health Canada* da *Canadian Food Inspection Agency* (CFIA) validou o Bax System® para a

detecção de *E. coli* O157:H7 em frutas, vegetais, produtos lácteos e outros alimentos (DUPONT QUALICON, 2007).

Pelo fato de basear-se na análise de regiões específicas do DNA microbiano, o resultado positivo poderia, teoricamente, ser considerado como definitivo. Porém, por ser um método delicado, que exige atenção nas transferências de pequenos volumes, manipulação e estocagem, bem como existe a possibilidade de serem detectadas células mortas quando presentes em número ao redor de  $10^2$ UFC/g ou ml, as amostras positivas devem passar por uma etapa de confirmação pelo método cultural tradicional (FENG, 2007; HEALTH CANADA, 2003)

Assim como em nosso trabalho, Farber et al. (1989) não detectou *L. monocytogenes* em nenhuma das 110 amostras de vegetais “in natura” analisadas, da mesma forma como Guerra et al. (2001) e Pingulkar et al. (2001), que avaliaram, respectivamente, 37 e 116 amostras de vegetais. Resultados semelhantes também foram relatados por Rosa (2002), que não encontrou o patógeno nas 140 amostras de hortaliças minimamente processadas analisadas e Previdi (2002), ao analisar 112 amostras de saladas de vegetais.

Uma baixa incidência de detecção de *L. monocytogenes* é relatada por Porto e Eiroa (2001) que, de 250 amostras de hortaliças 3,2% apresentaram-se positivas para o patógeno, assim como por Sagoo et. al. (2003 a e b) que encontraram 3% e 2,3% de amostras positivas a partir de, respectivamente, 2950 e 3852, analisadas. Maistro (2006) detectou apenas 2 amostras de vegetais minimamente processados positivas para *L. monocytogenes*, dentre 72 analisadas.

Utilizando o Bax<sup>®</sup> e metodologia tradicional para pesquisa de *L. monocytogenes* em vegetais minimamente processados, Fröder (2005) encontrou 1 amostra positiva dentre as 181 analisadas.

Quanto à ausência de *Salmonella*, poucos trabalhos apresentam resultado semelhante ao da presente pesquisa. Previdi (2002) não encontrou o microrganismo em nenhuma das 112 amostras de vegetais minimamente

processados, assim como Sagoo et al. (2003 a), ao analisarem 2950 amostras de vegetais.

A maioria dos trabalhos relatam ter detectado *Salmonella* em vegetais minimamente processados cuja prevalência de amostras positivas variou entre 0,1% e 25% (TAORMINA et al., 1999; ROSA, 2002; BARRETO et al., 2003; SAGOO et al., 2003b; FRODER, 2005; GONZÁLEZ-AGUILAR et al., 2005; PINHEIRO et al., 2005; MAISTRO, 2006).

Trabalhos sobre a prevalência de *E. coli* O157:H7 em vegetais minimamente processados são raros na literatura. Zepeda-López et al. (1995) e Previdi (2002) detectaram o microrganismo em, respectivamente, 17 de 99 amostras e 2 de 112 amostras de vegetais minimamente processados analisadas. Silva et al.(2003) não encontrou o patógeno em nenhuma das 869 amostras de vegetais analisadas.

Em relação aos patógenos pesquisados, os resultados obtidos pela presente pesquisa demonstram que os vegetais minimamente processados analisados encontram-se em condições de inocuidade.

## **5.2. Contagens de microrganismos indicadores em vegetais minimamente processados**

A microbiota dos alimentos, em geral, está associada com os microrganismos presentes no alimento cru ou “in natura”, bem como com aqueles contaminantes que ocorrem durante o manuseio, processamento e dos sobreviventes aos tratamentos de preservação, os quais permanecem durante o armazenamento do produto (CHITARRA, 2005).

Todos os vegetais possuem uma microbiota que subsiste na presença de quantidades traço de carboidratos, sais minerais e proteínas, os quais encontram dissolvidos na água exsudada pela epiderme ou epicarpo, ou que condensa da

atmosfera e deposita na superfície das plantas. Os microrganismos são considerados “deteriorantes” quando se desenvolvem no alimento, obtêm energia a partir de seus componentes básicos, e alteram as características físicas e sensoriais desse produto; são tidos como “indicadores” quando sua presença no alimento não se traduz como perigo ao consumidor, porém indica a possibilidade de presença de “patógenos” que, por sua vez, são considerados perigosos, quando causam doenças ao homem ou quando, sob determinadas condições, produzem toxinas que causam danos ao vegetal ou à saúde do consumidor, por promoverem intoxicações (CHITARRA, 2005).

Nos alimentos vegetais frescos, o único indicador de contaminação fecal efetivamente válido, de acordo com Franco e Landgraf (2003), é a *E. coli*, uma vez que os demais indicadores de contaminação fecal são encontrados naturalmente nesses alimentos, devido a seu contato com o solo, dentre outras fontes de microrganismos. As elevadas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, assim como de coliformes totais e bolores e leveduras indicam que a vida útil do produto está terminando, bem como práticas inadequadas de produção do alimento.

A determinação de coliformes totais indica a presença de diversos membros da família *Enterobacteriaceae*, um grupo de bactérias que inclui microrganismos potencialmente patogênicos associados ao trato intestinal de diversos animais, como a *Salmonella* e a *E. coli* O157:H7, e também diversas bactérias não patogênicas comumente encontradas no solo e ambiente.

Os coliformes termotolerantes são membros do grupo de bactérias coliforme, que crescem no trato intestinal de animais assim como em plantas. Sua distinção dos coliformes totais se dá através da capacidade de continuar fermentando a lactose entre 44,5 e 45,5°C. Nas análises de coliformes termotolerantes, em aproximadamente 90% dos casos o microrganismo presente é *E. coli*, real indicador de presença de fezes no alimento, e os 10% restantes abrigam, dentre outros microrganismos, algumas espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella*, provenientes de plantas, e portanto, de origem não fecal.

Contagens elevadas de coliformes totais em produtos frescos cortados não indicam necessariamente baixa qualidade do produto, ou mesmo precárias condições sanitárias (IFPA, 1997). Contudo, a presença de coliformes termotolerantes geralmente implica a presença de *E. coli*, que indica contaminação de origem fecal, comprometendo a inocuidade do produto.

Pelo fato de ainda não haver uma legislação específica para vegetais e frutas minimamente processados no Brasil, tanto empresários do ramo quanto pesquisadores e consultores da área de alimentos formaram um grupo de estudos, cuja oficialização da existência está publicada no Diário Oficial da União (BRASIL, 2006) com o objetivo de propor uma normatização e regulamentação do setor de produtos minimamente processados, de forma a abranger não só sua qualidade microbiológica mas também todas as etapas que envolvem a cadeia produtiva desses alimentos como um todo.

Como parâmetro de especificação na legislação foi seguido o disposto na RDC nº12 de 02/01/2001 (BRASIL, 2001), que se aplica aos Grupos de Alimentos 1 e 2, respectivamente de “frutas, produtos de frutas ou similares frescas, *in-natura*, preparadas – descascadas ou selecionadas ou fracionadas – sanificadas, refrigeradas ou congeladas para consumo direto” e “hortaliças, legumes e similares, incluindo cogumelos comestíveis frescos, *in-natura*, preparados – descascados ou selecionados ou fracionados – sanificados, refrigerados ou congelados para consumo direto, com exceção do cogumelo”. Nestes grupos é preconizada ausência de *Salmonella* em 25g de amostra e tolerância máxima de coliformes a 45°C de  $5,0 \times 10^2$  UFC/g (2,69 logUFC/g) em frutas e de  $1,0 \times 10^2$  UFC/g (2,0 logUFC/g) em hortaliças. Sendo que, na referida resolução, a denominação de “coliformes a 45°C” é equivalente à denominação de “coliformes de origem fecal” e de “coliformes termotolerantes”. Quando *E. coli* estiver presente deverá constar no laudo analítico.

Em março de 2004, o Instituto de Defesa do Consumidor (IDEC) realizou uma pesquisa acerca da qualidade de verduras e legumes prontos para o consumo comercializados no Estado de São Paulo. Através da análise de 25 amostras (7 de agrião, 9 de alface e 9 de cenoura), encontrou contagens de

coliformes termotolerantes superiores ao estabelecido pela RDC no. 12 em 36% dos produtos. Após este incidente houve interesse dos empresários do ramo em se mobilizar de forma a regularizar o setor, retirando do mercado empresas que não primam pela comercialização de um produto de qualidade, tendo então sido formado o grupo de estudos anteriormente mencionado (FERNANDES, 2004).

Em relação a vegetais preparados para o consumo, a França e a Alemanha especificam em suas legislações ausência de *Salmonella* em 25g de amostra, tolerância máxima de  $10^2$ UFC/g (2 logUFC/g) de *L. monocytogenes*, e contagem de microrganismos aeróbios mesófilos até  $5,0 \times 10^7$ UFC/g (7,69 logUFC/g), no ponto de venda final. Na França, a especificação para coliformes fecais é  $<10^3$ UFC/g ( $<3$  logUFC/g) e na Alemanha  $<10^2$ UFC/g ( $<2$ logUFC/g) para *E. coli* (LEGNANI; LEONI, 2004).

O governo japonês, de acordo com Kaneko (1999) apud Maistro (2006), estabeleceu que o consumo de vegetais frescos que apresentem contagem padrão de microrganismos inferiores a  $10^5$ UFC/g (5 logUFC/g) é seguro, apesar de também não existir, assim como no Brasil, uma legislação específica para vegetais minimamente processados prontos para o consumo.

Além do preconizado na RDC nº12 de 02/01/2001 (BRASIL, 2001), com base nas referências anteriormente citadas (LEGNANI; LEONI, 2004; KANEKO, 1999 apud MAISTRO, 2006), adotamos para avaliação das amostras analisadas, as especificações máximas de 6 logUFC/g nas contagens de coliformes totais e de microrganismos aeróbios mesófilos totais e 4 logUFC/g na contagem de bolores e leveduras.

Na Tabela 3, podemos observar que, das 155 amostras de hortaliças minimamente processados analisadas, 45,16% (70/155) e 87,74% (136/155), respectivamente, apresentaram contagens de coliformes totais e microrganismos aeróbios mesófilos totais acima do limite de 6 logUFC/g. A contagem de bolores e leveduras apresentou-se acima do limite adotado em 58,06% (90/155) das amostras. Números em negrito indicam as amostras acima do limite estabelecido.

**Tabela 3.** Resultados das contagens de microrganismos em hortaliças minimamente processadas (expressos em logUFC/g)

| <b>Produto<br/>(data de análise)</b> | <b>Nº amostra</b> | <b>Coliformes totais</b> | <b><i>E. coli</i></b> | <b>Aeróbios<br/>totais</b> | <b>Bolores e<br/>leveduras</b> |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Alface lisa (26/07/05)               | 1                 | 4,75                     | <1                    | <b>8,32</b>                | <b>4,08</b>                    |
|                                      | 2                 | 4,96                     | <1                    | <b>7,97</b>                | <b>4,04</b>                    |
|                                      | 3                 | 4,52                     | <1                    | <b>8,75</b>                | <b>4,40</b>                    |
|                                      | 4                 | 4,08                     | <1                    | <b>6,20</b>                | 3,71                           |
|                                      | 5                 | 4,49                     | <1                    | <b>6,38</b>                | 3,91                           |
| Alface lisa (20/12/05)               | 6                 | 3,32                     | <2                    | 5,80                       | 3,34                           |
|                                      | 7                 | 3,04                     | <2                    | 5,94                       | 2,00                           |
|                                      | 8                 | 2,70                     | <2                    | <b>6,94</b>                | 3,23                           |
|                                      | 9                 | 4,00                     | <2                    | <b>7,23</b>                | 3,72                           |
|                                      | 10                | 5,90                     | <2                    | <b>7,40</b>                | 3,72                           |
| Alface americana<br>(10/08/05)       | 11                | 3,94                     | <2                    | 5,57                       | 3,67                           |
|                                      | 12                | 3,00                     | <2                    | 4,66                       | 2,78                           |
|                                      | 13                | 3,60                     | <2                    | 5,94                       | 3,04                           |
|                                      | 14                | 3,30                     | <2                    | 5,15                       | 3,49                           |
|                                      | 15                | 4,57                     | <2                    | 5,67                       | 3,44                           |
| Alface americana<br>(01/11/05)       | 16                | 3,66                     | <2                    | <b>7,40</b>                | <2                             |
|                                      | 17                | 4,41                     | <2                    | <b>7,23</b>                | 2,30                           |
|                                      | 18                | 4,63                     | <2                    | <b>6,60</b>                | 2,00                           |
| Alface americana<br>(13/12/05)       | 19                | <b>6,61</b>              | <2                    | <b>8,92</b>                | <b>4,30</b>                    |
|                                      | 20                | 5,61                     | <2                    | <b>9,86</b>                | 3,46                           |
|                                      | 21                | <b>7,11</b>              | <b>4,18</b>           | <b>8,43</b>                | 3,50                           |
|                                      | 22                | 5,65                     | <2                    | <b>8,95</b>                | 3,08                           |
|                                      | 23                | 5,64                     | <2                    | <b>9,04</b>                | <b>4,30</b>                    |
| Alface mimosa<br>(17/08/05)          | 24                | 2,84                     | <2                    | 5,49                       | 3,04                           |
|                                      | 25                | <2                       | <2                    | 5,23                       | <2                             |
|                                      | 26                | 2,60                     | <b>3,15</b>           | <b>6,11</b>                | 2,00                           |
|                                      | 27                | 2                        | <2                    | 5,32                       | 2,48                           |
|                                      | 28                | 2                        | <b>3,34</b>           | 5,97                       | 2,48                           |
| Alface crespa<br>(31/08/05)          | 29                | <b>6,04</b>              | <2                    | <b>7,53</b>                | 3,81                           |
|                                      | 30                | 4,08                     | <2                    | <b>6,36</b>                | 2,48                           |
|                                      | 31                | 3,00                     | <2                    | <b>6,14</b>                | 2,90                           |
|                                      | 32                | 5,25                     | <2                    | <b>7,08</b>                | 3,95                           |
|                                      | 33                | 5,28                     | <2                    | <b>7,25</b>                | 2,70                           |
| Almeirão picado<br>(21/11/05)        | 34                | <b>6,75</b>              | <b>2,78</b>           | <b>8,36</b>                | <b>4,30</b>                    |
|                                      | 35                | <b>6,38</b>              | <2                    | <b>8,23</b>                | <b>4,36</b>                    |
|                                      | 36                | <b>7,36</b>              | <2                    | <b>8,41</b>                | <b>4,74</b>                    |
|                                      | 37                | <b>6,56</b>              | <b>2,30</b>           | <b>8,28</b>                | <b>4,43</b>                    |
|                                      | 38                | <b>6,49</b>              | <2                    | <b>8,34</b>                | <b>4,63</b>                    |
| <b>No. amostras acima do limite</b>  |                   | <b>8</b>                 | <b>5</b>              | <b>27</b>                  | <b>10</b>                      |

**Tabela 3.** Continuação

| <b>Produto<br/>(data de análise)</b> | <b>Nº amostra</b> | <b>Coliformes totais</b> | <b><i>E. coli</i></b> | <b>Aeróbios<br/>totais</b> | <b>Bolores e<br/>leveduras</b> |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Agrião<br>(01/11/05)                 | 39                | 5,23                     | <b>2,70</b>           | <b>7,45</b>                | <b>4,56</b>                    |
|                                      | 40                | 5,18                     | <2                    | <b>7,50</b>                | <b>4,18</b>                    |
|                                      | 41                | 4,65                     | <b>3,00</b>           | <b>7,25</b>                | <b>4,60</b>                    |
| Acelga fatiada<br>(01/11/05)         | 42                | <b>6,45</b>              | <2                    | <b>8,00</b>                | <b>4,80</b>                    |
|                                      | 43                | 5,51                     | <2                    | <b>7,62</b>                | <b>4,14</b>                    |
| Chicória<br>(13/12/05)               | 44                | <b>7,04</b>              | <2                    | <b>9,00</b>                | <b>5,18</b>                    |
|                                      | 45                | <b>7,15</b>              | <2                    | <b>8,72</b>                | <b>5,32</b>                    |
|                                      | 46                | <b>7,25</b>              | <2                    | <b>9,00</b>                | <b>5,64</b>                    |
|                                      | 47                | <b>7,18</b>              | <2                    | <b>9,04</b>                | <b>5,65</b>                    |
|                                      | 48                | <b>7,04</b>              | <2                    | <b>8,96</b>                | <b>5,41</b>                    |
| Couve picada<br>(26/07/05)           | 49                | <b>8,25</b>              | <b>7,50</b>           | <b>9,45</b>                | <b>4,18</b>                    |
|                                      | 50                | <b>7,52</b>              | <b>5,48</b>           | <b>9,20</b>                | <b>4,30</b>                    |
|                                      | 51                | <b>8,08</b>              | <b>7,28</b>           | <b>9,36</b>                | <b>5,04</b>                    |
|                                      | 52                | <b>7,88</b>              | <b>6,11</b>           | <b>9,48</b>                | <b>4,62</b>                    |
|                                      | 53                | <b>8,11</b>              | <b>6,63</b>           | <b>9,32</b>                | <b>4,88</b>                    |
| Couve picada<br>(21/09/05)           | 54                | <b>6,38</b>              | <2                    | <b>7,60</b>                | 3,52                           |
|                                      | 55                | <b>6,18</b>              | <b>2,90</b>           | <b>7,56</b>                | 2,78                           |
|                                      | 56                | <b>6,32</b>              | <2                    | <b>7,70</b>                | 3,41                           |
|                                      | 57                | <b>6,36</b>              | <2                    | <b>7,90</b>                | <b>4,18</b>                    |
|                                      | 58                | <b>6,04</b>              | <2                    | <b>7,93</b>                | <b>4,52</b>                    |
| Couve picada<br>(29/09/05)           | 59                | 5,69                     | <b>3,48</b>           | <b>7,28</b>                | 3,04                           |
|                                      | 60                | <b>6,32</b>              | <b>3,00</b>           | <b>7,96</b>                | <b>4,08</b>                    |
|                                      | 61                | 5,56                     | <b>3,30</b>           | <b>7,57</b>                | 2,60                           |
|                                      | 62                | 5,60                     | <b>3,30</b>           | <b>7,18</b>                | 3,59                           |
|                                      | 63                | <b>6,41</b>              | <b>3,60</b>           | <b>7,82</b>                | 3,61                           |
| Couve picada<br>(01/11/05)           | 64                | 4,59                     | <b>2,48</b>           | <b>7,18</b>                | 3,75                           |
|                                      | 65                | <b>6,08</b>              | <b>2,48</b>           | <b>7,70</b>                | <b>4,20</b>                    |
| Rúcula<br>(31/08/05)                 | 66                | <b>6,73</b>              | <2                    | <b>8,00</b>                | 3,28                           |
|                                      | 67                | <b>6,82</b>              | <2                    | <b>8,25</b>                | <b>4,78</b>                    |
|                                      | 68                | 5,40                     | <2                    | <b>7,20</b>                | <b>4,30</b>                    |
|                                      | 69                | 5,46                     | <2                    | <b>7,48</b>                | <b>4,80</b>                    |
|                                      | 70                | 5,56                     | <b>2,30</b>           | <b>7,88</b>                | <b>4,48</b>                    |
| Rúcula<br>(18/10/05)                 | 71                | <b>6,11</b>              | <b>3,11</b>           | <b>8,03</b>                | <b>5,15</b>                    |
|                                      | 72                | <b>6,40</b>              | <b>2,70</b>           | <b>7,62</b>                | <b>5,30</b>                    |
|                                      | 73                | <b>6,50</b>              | <b>4,04</b>           | <b>8,14</b>                | <b>4,88</b>                    |
|                                      | 74                | <b>6,50</b>              | <b>3,78</b>           | <b>8,32</b>                | <b>4,88</b>                    |
|                                      | 75                | 5,61                     | <b>2,78</b>           | <b>7,67</b>                | <b>5,11</b>                    |
| <b>No. amostras acima do limite</b>  |                   | <b>25</b>                | <b>21</b>             | <b>37</b>                  | <b>28</b>                      |

**Tabela 3.** Continuação

| <b>Produto<br/>(data de análise)</b> | <b>Nº amostra</b> | <b>Coliformes totais</b> | <b><i>E. coli</i></b> | <b>Aeróbios<br/>totais</b> | <b>Bolores e<br/>leveduras</b> |
|--------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Repolho roxo<br>(24/08/05)           | 76                | 4,23                     | <2                    | 5,34                       | 2,00                           |
|                                      | 77                | 4,11                     | <2                    | 4,30                       | 2,00                           |
|                                      | 78                | 4,00                     | <2                    | 5,15                       | 2,00                           |
|                                      | 79                | 4,23                     | <2                    | 5,77                       | 3,30                           |
|                                      | 80                | 4,23                     | <2                    | <b>6,08</b>                | 2,00                           |
| Repolho branco<br>(21/09/05)         | 81                | <b>7,18</b>              | <2                    | <b>9,34</b>                | <b>5,20</b>                    |
|                                      | 82                | <b>6,82</b>              | <2                    | <b>9,00</b>                | <b>4,93</b>                    |
|                                      | 83                | <b>6,48</b>              | <b>4,95</b>           | <b>8,20</b>                | <b>5,34</b>                    |
|                                      | 84                | <b>6,87</b>              | <b>5,30</b>           | <b>9,04</b>                | <b>4,79</b>                    |
|                                      | 85                | 5,80                     | <b>2,78</b>           | <b>9,32</b>                | <b>4,38</b>                    |
| Cenoura ralada<br>(03/08/05)         | 86                | 3,43                     | <b>2,78</b>           | 4,85                       | <b>4,23</b>                    |
|                                      | 87                | 4,36                     | <b>3,20</b>           | <b>6,08</b>                | <b>4,30</b>                    |
|                                      | 88                | 5,11                     | <b>2,70</b>           | <b>7,93</b>                | <b>4,23</b>                    |
|                                      | 89                | 4,23                     | <b>2,90</b>           | <b>&gt;9,81</b>            | <b>4,49</b>                    |
|                                      | 90                | 4,23                     | <b>3,25</b>           | <b>7,87</b>                | <b>4,28</b>                    |
| Cenoura ralada<br>(05/09/05)         | 91                | <b>7,41</b>              | <2                    | <b>9,59</b>                | <b>6,80</b>                    |
|                                      | 92                | <b>7,76</b>              | <2                    | <b>9,23</b>                | <b>6,61</b>                    |
|                                      | 93                | 2,00                     | <2                    | <b>9,78</b>                | <b>6,70</b>                    |
|                                      | 94                | <b>7,58</b>              | <2                    | <b>8,84</b>                | <b>6,61</b>                    |
|                                      | 95                | <2                       | <2                    | <b>9,66</b>                | <b>5,23</b>                    |
| Cenoura ralada<br>(28/09/05)         | 96                | 5,08                     | <b>&gt;2 e &lt;3</b>  | <b>6,11</b>                | 2,84                           |
|                                      | 97                | 5,00                     | <b>&gt;2 e &lt;3</b>  | <b>6,14</b>                | 2,48                           |
|                                      | 98                | 4,36                     | <b>&gt;2 e &lt;3</b>  | 5,78                       | 2,30                           |
|                                      | 99                | 4,78                     | <b>&gt;2 e &lt;3</b>  | <b>6,00</b>                | 2,48                           |
|                                      | 100               | 4,75                     | <b>&gt;2 e &lt;3</b>  | <b>6,45</b>                | 2,70                           |
| Cenoura baby<br>(21/09/05)           | 101               | 5,28                     | <2                    | 4,08                       | 3,18                           |
|                                      | 102               | 5,08                     | <2                    | <b>6,30</b>                | 3,25                           |
|                                      | 103               | 5,04                     | <2                    | <b>6,40</b>                | 3,28                           |
|                                      | 104               | <b>6,54</b>              | <2                    | <b>6,72</b>                | 3,40                           |
|                                      | 105               | 5,60                     | <2                    | <b>6,46</b>                | 3,23                           |
| Beterraba ralada<br>(10/08/05)       | 106               | 2,70                     | <2                    | <b>6,45</b>                | 3,80                           |
|                                      | 107               | 3,47                     | <2                    | <b>6,53</b>                | <b>4,34</b>                    |
|                                      | 108               | 2,30                     | <2                    | <b>6,5</b>                 | 3,99                           |
|                                      | 109               | <2                       | <2                    | <b>6,84</b>                | 3,87                           |
|                                      | 110               | 2,48                     | <2                    | <b>7,00</b>                | <b>4,38</b>                    |
| Abobrinha ralada<br>(17/08/05)       | 111               | <b>7,41</b>              | <b>3,00</b>           | <b>9,38</b>                | <b>6,65</b>                    |
|                                      | 112               | <b>7,15</b>              | <2                    | <b>9,11</b>                | <b>6,00</b>                    |
|                                      | 113               | <b>7,60</b>              | <2                    | <b>8,15</b>                | <b>6,49</b>                    |
|                                      | 114               | <b>7,30</b>              | <2                    | <b>7,65</b>                | <b>5,58</b>                    |
|                                      | 115               | <b>7,52</b>              | <2                    | <b>8,63</b>                | <b>6,62</b>                    |
| <b>No. amostras acima do limite</b>  |                   | <b>13</b>                | <b>14</b>             | <b>33</b>                  | <b>22</b>                      |

**Tabela 3.** Continuação

| <b>Produto<br/>(data de análise)</b>  | <b>Nº amostra</b> | <b>Coliformes totais</b> | <b><i>E. coli</i></b> | <b>Aeróbios<br/>totais</b> | <b>Bolores e<br/>leveduras</b> |
|---------------------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Salada 1*<br>(03/08/05)               | 116               | 2,95                     | <b>2,30</b>           | <b>7,00</b>                | 3,61                           |
|                                       | 117               | <b>6,34</b>              | <2                    | <b>6,00</b>                | <b>4,48</b>                    |
|                                       | 118               | 3,38                     | <2                    | 3,72                       | 3,70                           |
|                                       | 119               | 2,95                     | <2                    | <b>6,00</b>                | 3,54                           |
|                                       | 120               | 3,36                     | <2                    | <b>6,53</b>                | 3,08                           |
| Salada tricolor*<br>(24/08/05)        | 121               | 4,89                     | <2                    | <b>7,53</b>                | 3,08                           |
|                                       | 122               | <b>6,23</b>              | <2                    | <b>6,32</b>                | 3,20                           |
|                                       | 123               | 5,36                     | <2                    | <b>6,20</b>                | 3,34                           |
|                                       | 124               | 4,45                     | <2                    | <b>6,40</b>                | 2,95                           |
|                                       | 125               | 4,30                     | <2                    | <b>6,45</b>                | 3,28                           |
| Salada 3*<br>(05/09/05)               | 126               | <b>7,95</b>              | <2                    | <b>9,11</b>                | <b>6,65</b>                    |
|                                       | 127               | <b>7,84</b>              | <2                    | <b>8,75</b>                | <b>6,57</b>                    |
|                                       | 128               | <b>7,48</b>              | <b>5,30</b>           | <b>8,63</b>                | <b>6,6</b>                     |
|                                       | 129               | <b>7,67</b>              | <b>6,00</b>           | <b>9,00</b>                | <b>6,53</b>                    |
|                                       | 130               | <b>7,72</b>              | <2                    | <b>8,97</b>                | <b>6,74</b>                    |
| Salada 4*<br>(28/09/05)               | 131               | <b>6,85</b>              | >2 e <3               | <b>7,57</b>                | <b>4,25</b>                    |
|                                       | 132               | <b>7,11</b>              | >2 e <3               | <b>7,89</b>                | <b>4,46</b>                    |
|                                       | 133               | 5,20                     | >2 e <3               | <b>6,67</b>                | 3,87                           |
|                                       | 134               | 4,71                     | >2 e <3               | <b>6,08</b>                | <b>4,23</b>                    |
|                                       | 135               | 5,08                     | >2 e <3               | <b>6,41</b>                | <b>4,20</b>                    |
| Salada 5*<br>(26/10/05)               | 136               | <b>7,32</b>              | <2                    | <b>8,98</b>                | <b>5,56</b>                    |
|                                       | 137               | <b>7,56</b>              | <2                    | <b>8,32</b>                | <b>4,8</b>                     |
|                                       | 138               | <b>7,34</b>              | <2                    | <b>8,99</b>                | <b>5,45</b>                    |
|                                       | 139               | <b>7,46</b>              | <2                    | <b>9,20</b>                | <b>5,98</b>                    |
|                                       | 140               | <b>7,48</b>              | <2                    | <b>9,15</b>                | <b>5,81</b>                    |
| Salada Green*<br>(05/12/05)           | 141               | 5,40                     | <b>2,08</b>           | <b>7,43</b>                | <b>4,18</b>                    |
|                                       | 142               | 5,11                     | <b>2,32</b>           | <b>7,23</b>                | <b>4,23</b>                    |
|                                       | 143               | 5,30                     | <2                    | <b>7,25</b>                | <b>4,04</b>                    |
|                                       | 144               | 5,20                     | <b>2,18</b>           | <b>7,14</b>                | <b>4,49</b>                    |
|                                       | 145               | 5,08                     | <2                    | <b>7,81</b>                | <b>4,25</b>                    |
| Mistinha*<br>(05/12/05)               | 146               | <b>7,50</b>              | <2                    | <b>8,92</b>                | <b>5,54</b>                    |
|                                       | 147               | <b>7,38</b>              | <2                    | <b>8,45</b>                | <b>5,23</b>                    |
|                                       | 148               | <b>7,44</b>              | <2                    | <b>8,89</b>                | <b>5,43</b>                    |
|                                       | 149               | <b>7,36</b>              | <2                    | <b>8,84</b>                | <b>5,43</b>                    |
|                                       | 150               | <b>7,46</b>              | <2                    | <b>9,11</b>                | <b>6,08</b>                    |
| Salada 8*<br>(20/12/05)               | 151               | <b>7,66</b>              | <2                    | <b>8,34</b>                | <b>4,90</b>                    |
|                                       | 152               | <b>7,70</b>              | <2                    | <b>8,32</b>                | <b>5,04</b>                    |
|                                       | 153               | <b>7,41</b>              | <2                    | <b>8,08</b>                | <b>4,82</b>                    |
|                                       | 154               | <b>6,67</b>              | <2                    | <b>7,71</b>                | <b>4,41</b>                    |
|                                       | 155               | <b>6,68</b>              | <2                    | <b>7,75</b>                | <b>4,57</b>                    |
| <b>Nº amostras acima limite</b>       |                   | <b>24</b>                | <b>12</b>             | <b>39</b>                  | <b>30</b>                      |
| <b>Nº TOTAL amostras acima limite</b> |                   | <b>70</b>                | <b>51</b>             | <b>136</b>                 | <b>90</b>                      |

\*Salada 1: Cenoura, repolhos branco e roxo;  
 Salada tricolor: batata, cenoura e vagem;  
 Salada 3: Alface, beterraba e cenoura;  
 Salada 4: Cenoura, couve, repolhos branco e roxo;  
 Salada 5: Alface crespa, cenoura e repolho roxo;  
 Salada Green: Alface, agrião e rúcula;  
 Mistinha: Alface americana, cenoura, beterraba e rabanete;  
 Salada 8: Cenoura e beterraba raladas

As amostras de cenoura ralada (96 a 100) e salada 4 (131 a 135) apresentaram o resultado de *E. coli*  $>2$  e  $<3$  logUFC/g devido a formação excessiva de bolhas de gás nas placas de diluição  $10^{-2}$ , impedindo a contagem de colônias, porém, com “manchas azuladas”, indicando possível presença do microrganismo. Porém, as placas de diluição  $10^{-3}$  não continham colônias típicas de *E. coli*.

Quanto às amostras de frutas, do total de 25 amostras analisadas, 36% (9/25) superaram os limites preconizados para coliformes totais, 68% para contagem de aeróbios mesófilos totais e 60% (17/25) para bolores e leveduras, como pode ser observado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultado das contagens de microrganismos em frutas minimamente processadas (expressos em logUFC/g)

| Produto<br>(data de análise)              | Nº amostra | Coliformes totais | <i>E. coli</i> | Aeróbios totais | Bolores e leveduras |
|-------------------------------------------|------------|-------------------|----------------|-----------------|---------------------|
| Polpa de maracujá azedo (05/10/05)        | 156        | <1                | <1             | 2,60            | 3,18                |
|                                           | 157        | <1                | <1             | 3,85            | <b>6,78</b>         |
|                                           | 158        | <1                | <1             | 4,00            | <b>7,00</b>         |
|                                           | 159        | <1                | <1             | 2,30            | 3,00                |
|                                           | 160        | <1                | <1             | 2,70            | 3,40                |
| Melão amarelo nacional fatiado (05/10/05) | 161        | <b>6,36</b>       | <2             | <b>9,00</b>     | <b>5,18</b>         |
|                                           | 162        | <b>6,41</b>       | <2             | <b>9,08</b>     | <b>7,40</b>         |
|                                           | 163        | <b>7,14</b>       | <2             | <b>9,11</b>     | <b>7,30</b>         |
|                                           | 164        | 5,43              | <2             | <b>9,30</b>     | <b>5,00</b>         |
|                                           | 165        | <b>6,15</b>       | <2             | <b>9,00</b>     | <b>5,78</b>         |
| Melão verde fatiado (18/10/05)            | 166        | 5,11              | <2             | <b>6,87</b>     | <b>5,04</b>         |
|                                           | 167        | <b>6,00</b>       | <2             | <b>6,32</b>     | <b>4,14</b>         |
|                                           | 168        | 4,04              | <2             | <b>6,41</b>     | 3,30                |

**Tabela 4.** Continuação

| <b>Produto<br/>(data de análise)</b>          | <b>Nº amostra</b> | <b>Coliformes totais</b> | <b>E. coli</b> | <b>Aeróbios<br/>totais</b> | <b>Bolores e<br/>leveduras</b> |
|-----------------------------------------------|-------------------|--------------------------|----------------|----------------------------|--------------------------------|
|                                               | 169               | <b>7,00</b>              | <2             | <b>7,71</b>                | <b>6,20</b>                    |
|                                               | 170               | <b>6,41</b>              | <2             | <b>6,30</b>                | <b>4,59</b>                    |
| Mamão papaya<br>cortado ao meio<br>(26/10/05) | 171               | <2                       | <2             | <b>7,14</b>                | 3,59                           |
|                                               | 172               | <b>8,45</b>              | <2             | <b>7,20</b>                | 3,00                           |
|                                               | 173               | 5,38                     | <b>3,7</b>     | <b>8,99</b>                | 3,18                           |
|                                               | 174               | <b>6,30</b>              | <2             | <b>8,57</b>                | 3,04                           |
|                                               | 175               | <2                       | <2             | <b>8,04</b>                | <b>4,38</b>                    |
| Abacaxi descascado<br>e fatiado (21/11/05)    | 176               | <1                       | <1             | 5,90                       | <b>5,56</b>                    |
|                                               | 177               | <1                       | <1             | 5,43                       | <b>4,64</b>                    |
|                                               | 178               | 2,30                     | <1             | 4,80                       | <b>5,04</b>                    |
|                                               | 179               | <1                       | <1             | 4,28                       | <b>4,15</b>                    |
|                                               | 180               | <1                       | <1             | 4,56                       | <b>4,59</b>                    |
| <b>Nº total amostras acima do limite</b>      |                   | <b>9</b>                 | <b>1</b>       | <b>15</b>                  | <b>17</b>                      |

Para as amostras de polpa de maracujá e abacaxi, o limite de detecção de coliformes totais e *E. coli* foi menor (1 logUFC/g) em relação ao das outras frutas (2 logUFC/g) devido a acidez dos produtos.

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a contagem de coliformes totais variou entre <1,0 e 8,45 logUFC/g, a de microrganismos aeróbios mesófilos totais entre 2,3 e 9,86 logUFC/g e de bolores e leveduras de <2 a 7,4 logUFC/g.

Pode ser observado, a partir da Figura 6, que dentre os vegetais que apresentam contagens de *E. coli* superiores ao estabelecido pela legislação vigente, a couve picada, as saladas em geral e a cenoura foram os que apresentaram as maiores contagens.

Dentre as amostras analisadas, 36,9% (32,9% de hortaliças e 4% de frutas) apresentaram valores de *E.coli* acima de 2,0 logUFC/g (hortaliças) e de 2,69 logUFC/g (frutas), sendo consideradas impróprias para o consumo humano. Dentre esses produtos, as hortaliças não indicadas para o consumo estão alface, almeirão, agrião, couve picada, rúcula, repolho, cenoura ralada, abobrinha ralada e saladas mistas, e a fruta que apresentou contagens elevadas de *E.coli* foi mamão papaya cortado, de acordo com a figura 6.

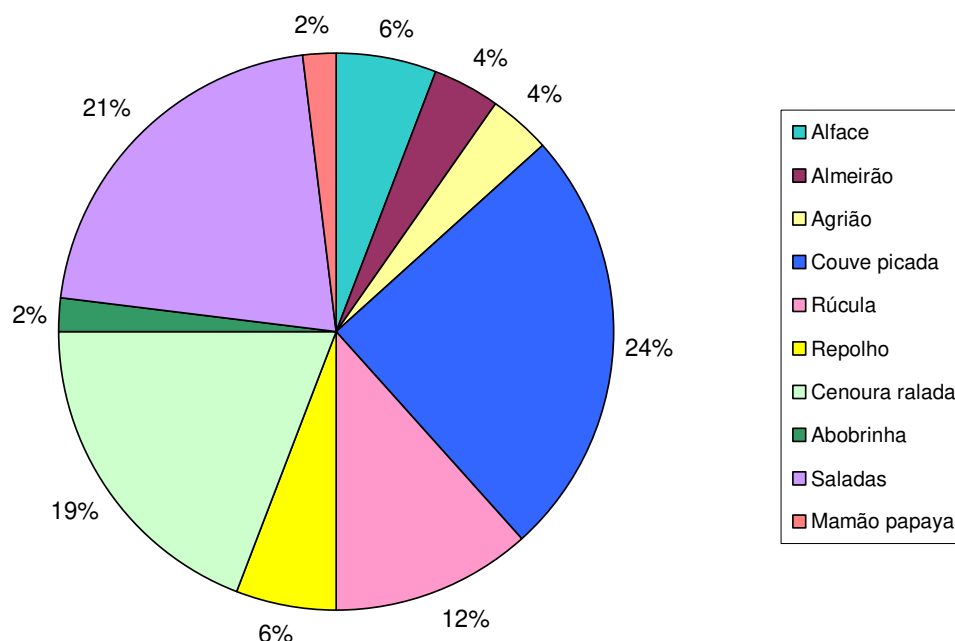


FIGURA 6: Vegetais minimamente processados com contagens de *E. coli* acima de 2 logUFC/g

Dados semelhantes ao do presente trabalho foram encontrados por outros autores, como Rosa (2002) que verificou que dentre as 140 amostras de hortaliças minimamente processadas provenientes de Campinas – SP e Belo Horizonte – MG, 94% apresentaram contagens de microrganismos aeróbios mesófilos totais superiores a 5 logUFC/g, 58,8% de bolores e leveduras acima de 4 logUFC/g e 68% apresentaram coliformes termotolerantes acima do padrão legal, sendo que dessas, 47% das amostras foram confirmadas como positivas para *E. coli*.

Um outro trabalho também relata elevada contagem de *E. coli* em amostras de vegetais minimamente processados, já que, de um total de 42 produtos analisados, 33,3% encontravam-se em desacordo com o estabelecido pela legislação brasileira vigente e desses, 26,2% apresentaram contagens de *E. coli* superiores a 2 logUFC/g (SANT'ANA, 2002).

Como os trabalhos anteriormente citados (ROSA, 2002; SANT'ÁNA, 2002) mostraram, nem todos os coliformes termotolerantes encontrados são *E. coli*. A legislação brasileira indica a análise de coliformes termotolerantes para vegetais minimamente processados, quando na realidade o mais significativo seria indicar a análise de *E. coli* diretamente. Há algum tempo existem métodos que permitem a quantificação rápida do microrganismo, como o Petrifilm da 3M Company, utilizado em nossa pesquisa.

De acordo com Doyle e Erickson (2006), outras espécies dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* estão associadas com plantas e não indicam contaminação fecal, contudo são detectadas no ensaio de coliformes termotolerantes. *E. coli* é o único indicador de contaminação fecal válido para monitorar alimentos contendo vegetais frescos. Para reduzir, portanto, a possibilidade de resultados falso-positivos, é recomendável um teste confirmativo para *E. coli*.

Um fato interessante que ilustra a observação de tais autores ocorreu em 1995 nos Estados Unidos, onde foi reportado que “a elevada contagem de coliformes fecais em chá indicava a presença de fezes na bebida”, sendo que a espécie dominante encontrada foi *Klebsiella pneumoniae* e algumas espécies de *Enterobacter*, mas não *E. coli*, que seria o único real indicador da presença de fezes no chá (DOYLE; ERICKSON, 2006).

Uma outra situação onde os coliformes fecais foram novamente interpretados como indicativos de presença de fezes ocorreu no Canadá, envolvendo dois “recalls” de brotos, os quais continham elevadas contagens de coliformes termotolerantes, identificados posteriormente como *Klebsiella pneumoniae*. Os perigos que acompanharam a descrição desses “recalls” indicavam que tais microrganismos eram causadores de doença gastrointestinal em humanos, quando, na realidade, essa bactéria é considerada um patógeno oportunista, que age fora do trato intestinal, causando infecções nos tratos urinário e respiratório (DOYLE; ERICKSON, 2006).

Ainda existe bastante desentendimento quanto à associação de coliformes termotolerantes e indicação de presença fecal em alimentos. Sendo assim, para minimizar futuras confusões a análise de coliformes termotolerantes deveria ser redefinida de modo a explicitar que esse grupo não é um real indicador da presença de fezes ou de *E. coli*, já que agrupa também outros microrganismos.

Na Tabela 5 pode ser observado que, dentre os produtos analisados que apresentavam contagens de *E. coli* acima do padrão tolerável (52 amostras), a maioria se encontrava entre o primeiro e segundo dia de vida útil (41 amostras), sendo que as contagens variaram entre 2,08 logUFC/g e 5,3 logUFC/g. Quanto aos vegetais analisados entre o terceiro e quarto dia da vida de prateleira (10 amostras), as contagens do microrganismo variaram entre 3,0 logUFC/g e 7,5 logUFC/g. Finalmente, a única hortaliça fora do padrão para *E. coli*, que foi analisada no último dia do prazo de validade apresentou contagem de 2,3 logUFC/g.

Sendo assim, não se pode afirmar que quanto mais próximo do final do prazo de validade o produto estiver, mais comprometida está a sua qualidade microbiológica em relação à presença de *E. coli*, já que produtos expostos no supermercado no primeiro dia de vida útil apresentaram contagens superiores àquele que foi analisado no último dia de validade.

Por exemplo, agrião 41 e couve picada 59 apresentaram contagem de 3,0 e 3,48 logUFC/g de *E. coli*, respectivamente, estando no primeiro dia do prazo de validade quando foram analisados, assim como rúculas 73 e 74, que apresentaram, respectivamente 4,04 e 3,78 logUFC/g. Tais contagens são mais altas do que a da amostra de rúcula 70 (2,30 logUFC/g), que foi analisada no último dia de vida de prateleira.

Sabe-se que *E. coli* é um microrganismo mesófilo, cuja temperatura ideal para multiplicação encontra-se entre 25°C e 40°C. Sendo assim, o armazenamento dos vegetais sob refrigeração é considerado uma barreira para a multiplicação. As reações metabólicas microbianas são catalisadas por enzimas, cuja atividade está diretamente relacionada com a temperatura. Conforme há um aumento da temperatura, há um crescimento na taxa de reação enzimática.

Abaixo de 7°C, somente os microrganismos psicrotróficos e alguns mesófilos são capazes de se multiplicar. (FRANCO; LANDGRAF, 2003; JAY, 2005).

**Tabela 5.** Relação entre vegetais minimamente processados com contagens de *E. coli* acima do limite tolerável e vida útil do produto na data da análise microbiológica

| Alimento            | <i>E. coli</i><br>(logUFC/g) | Prazo de validade<br>(dias) | Vida útil na data da<br>análise (dias) |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|
| Alface americana 21 | 4,18                         | 5                           | 1                                      |
| Alface mimosa 26    | 3,15                         | 5                           | 4                                      |
| Alface mimosa 28    | 3,34                         | 5                           | 4                                      |
| Almeirão 34         | 2,78                         | 5                           | 2                                      |
| Almeirão 37         | 2,30                         | 5                           | 2                                      |
| Agrião 39           | 2,70                         | 5                           | 1                                      |
| Agrião 41           | 3,00                         | 5                           | 1                                      |
| Couve picada 49     | 7,50                         | 5                           | 3                                      |
| Couve picada 50     | 5,48                         | 5                           | 3                                      |
| Couve picada 51     | 7,28                         | 5                           | 3                                      |
| Couve picada 52     | 6,11                         | 5                           | 3                                      |
| Couve picada 53     | 6,63                         | 5                           | 3                                      |
| Couve picada 55     | 2,90                         | 5                           | 2                                      |
| Couve picada 59     | 3,48                         | 7                           | 1                                      |
| Couve picada 60     | 3,00                         | 7                           | 1                                      |
| Couve picada 61     | 3,30                         | 7                           | 1                                      |
| Couve picada 62     | 3,30                         | 7                           | 1                                      |
| Couve picada 63     | 3,60                         | 7                           | 1                                      |
| Couve picada 64     | 2,48                         | 5                           | 1                                      |
| Couve picada 65     | 2,48                         | 5                           | 1                                      |
| Rúcula 70           | 2,30                         | 6                           | 6                                      |
| Rúcula 71           | 3,11                         | 6                           | 1                                      |
| Rúcula 72           | 2,70                         | 6                           | 1                                      |
| Rúcula 73           | 4,04                         | 6                           | 1                                      |
| Rúcula 74           | 3,78                         | 6                           | 1                                      |
| Rúcula 75           | 2,78                         | 6                           | 1                                      |
| Repolho branco 83   | 4,95                         | 5                           | 2                                      |
| Repolho branco 84   | 5,30                         | 5                           | 2                                      |
| Repolho branco 85   | 2,78                         | 5                           | 2                                      |
| Cenoura ralada 86   | 2,78                         | 6                           | 1                                      |

**Tabela 5.** Continuação

| <b>Alimento</b>      | <b><i>E. coli</i><br/>(logUFC/g)</b> | <b>Prazo de validade<br/>(dias)</b> | <b>Vida útil na data da<br/>análise (dias)</b> |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------------------|
| Cenoura ralada 87    | 3,20                                 | 6                                   | 1                                              |
| Cenoura ralada 88    | 2,70                                 | 6                                   | 1                                              |
| Cenoura ralada 89    | 2,90                                 | 6                                   | 1                                              |
| Cenoura ralada 90    | 3,25                                 | 6                                   | 1                                              |
| Cenoura ralada 96    | >2 e <3                              | 6                                   | 1                                              |
| Cenoura ralada 97    | >2 e <3                              | 6                                   | 1                                              |
| Cenoura ralada 98    | >2 e <3                              | 6                                   | 1                                              |
| Cenoura ralada 99    | >2 e <3                              | 6                                   | 1                                              |
| Cenoura ralada 100   | >2 e <3                              | 6                                   | 1                                              |
| Abobrinha palito 111 | 3,00                                 | 5                                   | 4                                              |
| Salada 116           | 2,30                                 | 6                                   | 1                                              |
| Salada 128           | 5,30                                 | 5                                   | 4                                              |
| Salada 129           | 6,00                                 | 5                                   | 4                                              |
| Salada 131           | >2 e <3                              | 6                                   | 2                                              |
| Salada 132           | >2 e <3                              | 6                                   | 2                                              |
| Salada 133           | >2 e <3                              | 6                                   | 2                                              |
| Salada 134           | >2 e <3                              | 6                                   | 2                                              |
| Salada 135           | >2 e <3                              | 6                                   | 2                                              |
| Salada Green 141     | 2,08                                 | 6                                   | 2                                              |
| Salada Green 142     | 2,32                                 | 6                                   | 2                                              |
| Salada Green 144     | 2,18                                 | 6                                   | 2                                              |
| Mamão papaya 173     | 3,70                                 | 2                                   | 1                                              |

Martins et al. (2003) analisaram 133 amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas comercializadas em São Paulo e encontraram 66% em desacordo com os limites estabelecidos pela legislação brasileira, sendo que as contagens de coliformes totais, fecais, psicrófilos e *Enterobacteriaceae* variaram entre 1 e 7 logUFC/g.

Em outra pesquisa realizada na cidade de São Paulo (FRÖDER, 2005), dentre 133 amostras de hortaliças prontas para o consumo 42% continham população de *Enterobacteriaceae* entre 5 – 6 logUFC/g e 73% apresentavam contagens de coliformes termotolerantes maior do que 2 logUFC/g.

Em relação às contagens de aeróbios mesófilos totais, na Tabela 6 pode ser observado que a maior parte das amostras 83,88% (151/180) apresentaram contagens de aeróbios mesófilos totais acima de 6 logUFC/g, atingindo valores de até 9,11 e 9,86 logUFC/g para melão amarelo fatiado e alface americana (Tabela 5), respectivamente. Já para os coliformes totais, grande parte dos produtos, 56,11% (101/180), apresentaram contagens menor ou igual a 6 logUFC/g.

Maistro (2006) encontrou, dentre as 100 amostras analisadas, contagens de aeróbios mesófilos totais superiores a 7 logUFC/g em 46% e 45,8% de hortaliças minimamente processadas embaladas sob atmosfera modificada passiva e ativa, respectivamente. Além do resultado obtido ter mostrado altas contagens de aeróbios mesófilos também denotou a baixa influência do acondicionamento sob atmosfera modificada ativa em relação ao crescimento microbiano. Quanto às contagens de *Escherichia coli*, 17% das amostras (acelga, chicória, couve manteiga e rúcula) apresentaram valores acima de 2 logUFC/g.

**Tabela 6.** Distribuição das amostras de vegetais minimamente processados, em relação à população de aeróbios mesófilos totais e coliformes totais

| População<br>(LogUFC/g) | No. Amostras              |                   |
|-------------------------|---------------------------|-------------------|
|                         | Aeróbios mesófilos totais | Coliformes totais |
| < 5                     | 13                        | 71                |
| 5,1 – 5,9               | 16                        | 30                |
| 6,0 – 6,9               | 35                        | 36                |
| 7,0 – 7,9               | 47                        | 39                |
| > 8                     | 69                        | 4                 |
| <b>TOTAL</b>            | <b>180</b>                | <b>180</b>        |

Trabalho realizado na Itália (LEGNANI; LEONI, 2004) mostrou que as contagens totais de aeróbios mesófilos em 21 amostras de saladas minimamente processadas variou de acordo com a temperatura e o tempo de incubação. As análises foram realizadas com 0, 5 e 10 dias de incubação nas temperaturas de 4°C e 20°C. Como a Itália não possui legislação específica para tais produtos, foram adotadas as legislações francesa e alemã, que limitam a contagem total em

6,69 logUFC/g. Dentre as amostras armazenadas a 4°C, 100% permaneceram apropriadas para o consumo até 10 dias de incubação. Quanto às armazenadas a 20°C, 19% encontravam-se impróprias para o consumo após 5 dias e 43% após 10 dias de incubação. Em relação às contagens de coliformes termotolerantes e *E. coli*, todas as amostras ficaram dentro do limite estabelecido, ou seja, <3 e <2 logUFC/g, respectivamente, independente do período ou temperatura de estocagem. Esse trabalho não obteve contagens de *E. coli*, diferindo dos resultados apresentados pelo presente estudo. Os autores relataram que, tanto a matéria-prima, quanto a água utilizada para sua irrigação eram de ótima qualidade, comprovando, portanto, que a qualidade do produto final está diretamente relacionada com as características iniciais da matéria-prima utilizada para o processamento.

Tournas (2005) conduziu um estudo, nos Estados Unidos, onde foram analisadas 39 saladas prontas para o consumo, 29 vegetais frescos inteiros e 116 brotos (feijão, alface, brócolis, alho, pimenta, cebola, entre outros), quanto às contagens de bolores e leveduras e possível presença de espécies toxigênicas. As leveduras foram predominantes, apresentando contagens entre <2 e 8,60 logUFC/g, já os bolores variaram entre <2 e 4,60 logUFC/g. Foram encontrados fungos toxigênicos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Alternaria*, em saladas prontas e vegetais frescos. Em relação aos brotos, além dos dois gêneros citados anteriormente também foi encontrado representantes do gênero *Phoma*.

De acordo com a Tabela 7, dentre as hortaliças que apresentaram maiores contagens de coliformes totais, foram encontradas, a couve (8,25 logUFC/g), seguida pelas saladas (7,95 logUFC/g) e pela cenoura (7,76 logUFC/g). Dentre as frutas, o mamão apresentou o maior valor de coliformes totais (8,45 logUFC/g).

Quanto às contagens de aeróbios mesófilos totais, a Tabela 7 mostra que dentre as hortaliças, a cenoura, alface e couve apresentaram os valores mais elevados, sendo esses 9,86, 9,81 e 9,48 logUFC/g, respectivamente. Em relação às frutas, o melão apresentou o maior valor (9,3 logUFC/g), seguido pelo mamão papaya (8,99 logUFC/g).

**Tabela 7.** Valores mínimos e máximos de contagens de coliformes totais, aeróbios mesófilos e bolores e leveduras em hortaliças e frutas minimamente processadas

| Produtos          | Intervalo de valores, em logUFC/g |                        |                     |
|-------------------|-----------------------------------|------------------------|---------------------|
|                   | Coliformes totais                 | Aeróbios mesófilos     | Bolores e leveduras |
| Alface            | <2 - 7,11                         | 4,66 - <b>9,86</b>     | <2 - 4,30           |
| Almeirão          | 6,49 - 7,36                       | 8,23 - 8,36            | 4,30 - 4,74         |
| Agrião            | 4,60 - 5,23                       | 7,25 - 7,45            | 4,10 - a 4,60       |
| Acelga            | 5,50 - 6,45                       | 7,62 - 8,00            | 4,14 - 4,80         |
| Chicória          | 7,04 - 7,25                       | 8,72 - 9,04            | 5,18 - 5,75         |
| Couve             | 4,59 - <b>8,25</b>                | 7,18 - <b>9,48</b>     | 2,60 - 5,04         |
| Rúcula            | 5,40 - 6,82                       | 7,20 - 8,32            | 4,88 - 5,30         |
| Repolho           | 4,00 - 7,18                       | 4,30 - 9,34            | 2,00 - 5,34         |
| Cenoura           | <2 - <b>7,76</b>                  | 4,08 - <b>&gt;9,81</b> | 2,30 - <b>6,80</b>  |
| Beterraba         | <2 - 3,47                         | 6,45 - 7,00            | 3,80 - 4,38         |
| Abobrinha         | 7,15 - 7,60                       | 7,65 - 9,38            | 5,58 - <b>6,65</b>  |
| Saladas           | 2,95 - <b>7,95</b>                | 3,72 - 9,11            | 2,95 - <b>6,74</b>  |
| Polpa de maracujá | <1                                | 2,30 - 3,85            | 3,00 - <b>7,00</b>  |
| Melão             | 4,04 - 7,14                       | 6,30 - <b>9,30</b>     | 3,30 - <b>7,40</b>  |
| Mamão             | <1 - <b>8,45</b>                  | 7,14 - <b>8,99</b>     | 3,00 - 4,38         |
| Abacaxi           | <1 - 2,30                         | 4,28 - 5,90            | 4,15 - 5,56         |

Em relação aos bolores e leveduras as maiores contagens, dentre hortaliças e legumes, foram obtidas para cenoura, saladas e abobrinha, correspondendo a 6,8; 6,74 e 6,65 logUFC/g, respectivamente. O melão foi, novamente, a fruta que apresentou a maior contagem (7,4 logUFC/g).

Trabalho realizado por Szabo et al. (2000) mostrou que de 120 amostras de alface minimamente processada, adquiridas durante 8 meses de supermercados australianos, 76% apresentaram contagem total de aeróbios entre 5 e 7 logUFC/g, com extremos entre 3 e 9 logUFC/g.

De acordo com a *International Fresh-cut Produce Association* (IFPA, 1997), valores elevados de contagem total não indicam risco à saúde do consumidor, porém sinalizam final de vida útil do produto e/ou abusos de temperatura, que refletem na qualidade do alimento, e não em sua segurança.

De acordo com a Tabela 8, pode-se observar que, independente do período de vida útil em que o produto se encontrava na data da análise, a contagem de aeróbios totais, na maioria dos lotes, atingiu valor igual ou maior do que 6 logUFC/g, ultrapassando, inclusive 9 logUFC/g. Alface americana (lote 5) e melão amarelo fatiado (lote 35), analisados entre o primeiro e segundo dia da validade, apresentaram contagens de 9,04 e 9,1 logUFC/g, respectivamente. A couve picada (lote 12), analisada entre o terceiro e quarto dia de vida útil, apresentou uma contagem de 9,36 logUFC/g, assim como cenoura ralada (lote 21), analisada no quinto dia do prazo de validade, com contagem de 9,42 logUFC/g.

**Tabela 8.** Relação entre contagem de microrganismo aeróbios mesófilos totais (média/lote) e data de análise de vegetais minimamente processados

| Produto          | Data da análise | No. lote | Prazo de validade (dias) | Contagem de aeróbios mesófilos totais (logUFC/g)    |             |         |
|------------------|-----------------|----------|--------------------------|-----------------------------------------------------|-------------|---------|
|                  |                 |          |                          | Período da validade quando realizada análise (dias) |             |         |
|                  |                 |          |                          | 1º e 2º                                             | 3º e 4º     | 5º ou > |
| Alface lisa      | 26/07/05        | 1        | 5                        |                                                     | 7,52        |         |
| Alface lisa      | 20/12/05        | 2        | 4                        |                                                     | 6,66        |         |
| Alface americana | 10/08/05        | 3        | 5                        | 5,39                                                |             |         |
| Alface americana | 01/11/05        | 4        | 4                        | 7,07                                                |             |         |
| Alface americana | 13/12/05        | 5        | 5                        | <b>9,04</b>                                         |             |         |
| Alface mimosa    | 17/08/05        | 6        | 5                        |                                                     | 5,62        |         |
| Alface crespa    | 31/08/05        | 7        | 6                        |                                                     |             | 6,87    |
| Almeirão picado  | 21/11/05        | 8        | 5                        | 8,32                                                |             |         |
| Agrião           | 01/11/05        | 9        | 4                        | 7,4                                                 |             |         |
| Acelga fatiada   | 01/11/05        | 10       | 4                        | 7,81                                                |             |         |
| Chicória         | 13/12/05        | 11       | 5                        | 8,94                                                |             |         |
| Couve picada     | 26/07/05        | 12       | 5                        |                                                     | <b>9,36</b> |         |
| Couve picada     | 21/09/05        | 13       | 5                        | 7,73                                                |             |         |
| Couve picada     | 29/09/05        | 14       | 7                        | 7,56                                                |             |         |
| Couve picada     | 01/11/05        | 15       | 4                        | 7,44                                                |             |         |
| Rúcula           | 31/08/05        | 16       | 6                        |                                                     |             | 7,76    |
| Rúcula           | 18/10/05        | 17       | 6                        | 7,95                                                |             |         |
| Repolho roxo     | 24/08/05        | 18       | 5                        | 5,32                                                |             |         |
| Repolho branco   | 21/09/05        | 19       | 5                        | 8,98                                                |             |         |
| Cenoura ralada   | 03/08/05        | 20       | 6                        | 6,68                                                |             |         |

**Tabela 8.** Continuação

| Produto                 | Data da análise | No. lote | Prazo de validade (dias) | Contagem de aeróbios mesófilos totais (logUFC/g)    |         |             |
|-------------------------|-----------------|----------|--------------------------|-----------------------------------------------------|---------|-------------|
|                         |                 |          |                          | Período da validade quando realizada análise (dias) |         |             |
|                         |                 |          |                          | 1º e 2º                                             | 3º e 4º | 5º ou >     |
| Cenoura ralada          | 05/09/05        | 21       | 5                        |                                                     |         | <b>9,42</b> |
| Cenoura ralada          | 28/09/05        | 22       | 6                        | 6,1                                                 |         |             |
| Cenoura baby            | 21/09/05        | 23       | 30                       |                                                     |         | 6,0         |
| Beterraba ralada        | 10/08/05        | 24       | 5                        | 6,66                                                |         |             |
| Abobrinha ralada        | 17/08/05        | 25       | 5                        |                                                     |         | 8,58        |
| Salada 1                | 03/08/05        | 26       | 6                        | 5,85                                                |         |             |
| Salada tricolor         | 24/08/05        | 27       | 5                        | 6,58                                                |         |             |
| Salada 3                | 05/09/05        | 28       | 5                        |                                                     |         | 8,9         |
| Salada 4                | 28/09/05        | 29       | 6                        | 6,92                                                |         |             |
| Salada 5                | 26/10/05        | 30       | 6                        | 8,92                                                |         |             |
| Salada Green            | 05/12/05        | 31       | 6                        | 7,37                                                |         |             |
| Mistinha                | 05/12/05        | 32       | 5                        |                                                     | 8,84    |             |
| Salada 8                | 20/12/05        | 33       | 6                        | 8,04                                                |         |             |
| Polpa de maracujá azedo | 05/10/05        | 34       | 1                        | 3,09                                                |         |             |
| Melão amarelo fatiado   | 05/10/05        | 35       | 1                        | <b>9,1</b>                                          |         |             |
| Melão verde fatiado     | 18/10/05        | 36       | 1                        | 6,72                                                |         |             |
| Mamão papaya metade     | 26/10/05        | 37       | 2                        | 7,98                                                |         |             |
| Abacaxi fatiado         | 21/11/05        | 38       | ND                       | 4,99                                                |         |             |

ND: Não disponível

## 6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A maioria das frutas e hortaliças minimamente processadas analisadas apresentou-se de acordo com os padrões da legislação brasileira vigente;
- Verificou-se ausência dos patógenos *E. coli* O157:H7, *Salmonella* e *L. monocytogenes* em 100% das amostras analisadas;
- Contagem de *E. coli* acima do permitido pela legislação foi observada em 32,9% de hortaliças e 4% de frutas minimamente processadas;
- Contagem de coliformes totais acima de 6 logUFC/g foi observada em 45,6% de hortaliças e 30% das frutas;
- Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais superior a 6 logUFC/g foi observada em 87,74% das hortaliças e 60% das frutas;
- Contagem superior a 4 logUFC/g de bolores e leveduras foi verificada em 58,06% das hortaliças e 68% de frutas.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em relação à saúde pública, as frutas e hortaliças minimamente processadas analisadas na presente pesquisa, apresentaram ausência de microrganismos patogênicos relevantes para os produtos em questão.

Quanto às condições higiênicas, as elevadas contagens obtidas são indicativas de falhas no processamento, seja no controle de qualidade da matéria-prima, seja no ambiente da planta de produção. Além disso, vale ressaltar a importância da manutenção da cadeia de frio, especialmente durante a permanência dos produtos em supermercados ou varejões, já que muitos microrganismos possuem o crescimento favorecido pela exposição do produto às temperaturas inadequadamente elevadas.

Para trabalhos futuros, seria de grande valia um monitoramento de todo o processo produtivo dos vegetais minimamente processados, verificando as condições do solo onde os produtos são cultivados, assim como a água de irrigação utilizada e a temperatura durante o processamento, já que o Brasil, sendo um país tropical, apresenta temperaturas médias elevadas durante grande parte do ano.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNUAL listing of Foodborne Disease Outbreaks, United States, 1990 - 2004. Outbreak Surveillance Data. Center for Diseases Control (CDC). Disponível em: [http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak\\_data.htm](http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/outbreak_data.htm). Acesso em: 16 set. 2006.

AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS), 2002. **Qualicon Bax System for *Salmonella***. Certification Report of AOAC Research Institute – Performance Tested Method 100201. Disponível em: <http://www.aoac.org/testkits/100201Salmonella%20Cert%20Report.pdf>. Acesso em 16 dez. 2006.

**Associação Brasileira de Horticultura**. Notícias – Economia: Cresce o mercado de hortaliças processadas no Brasil. 27/12/05. Disponível em: [http://www.abhorticultura.com.br/News/Default.asp?bus\\_chave=minimamente%20processados](http://www.abhorticultura.com.br/News/Default.asp?bus_chave=minimamente%20processados) . Acesso em: 11 mai. 2006.

AURELI, P.; FIORUCCI, G.C.; CAROLI, D.; MARCHIARO, G.; NOVARA, O.; LEONE, L.; SALMSAO, S. Na outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v. 342, p. 1236-1241, 2000.

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.

BARRETO, A.M.M.; JESUS, J.L.; COSTA, M.A. et. al. Ocorrência de *Salmonella spp* em hortaliças folhosas consumidas in-natura e produzidas comercialmente em Feira de Santana (BA). In: **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis – SC**, p. 168, 2003

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.

BEUCHAT, L. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 413 – 423, 2002.

BEUCHAT, L. R. Food safety issues. **Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review**. WHO/FSF/FOS/98.2. Food Safety Unit, World Health Organization, Geneva, 1998.

BEUCHAT, L.R. *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. **Food Control**, Letchworth, v.07, nº4/5, p.223-228, 1996b.

BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.59, nº02, p 204-216, 1996a

BEUCHAT, L.R. Standardization of methods to determine the efficacy of disinfectants for raw fruits and vegetables. *In*: TUIJTELAARS *et al.* (eds) Food Microbiology and Food safety into the next millenium. **Proceedings of 17<sup>th</sup>** International Conference of International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH), Vendhoven, The Netherlands, 13-17, September,1999, pg 785-786, 1999.

BEUCHAT, L.R. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* o157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. **Journal of Food Protection**, v. 62, p. 845-849, 1999a.

BEUCHAT, L.R. Vectors and conditions for preharvest contaminations of fruits and vegetables with pathogens capable of causing enteric diseases. **British Food Journal**, v. 108, no. 01, p. 38-53, 2006.

BRACKETT, R.E. Microbiological consequences of minimally processed fruits. **Journal of Food Quality**. v10, no.02, p. 195-206, 1987.

BRACKETT, R.E. Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. *In*: WILEY, R.C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. New York: Chapman & Hall, cap 1, p. 269-312, 1994.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução CNNPA 12 - Norma Técnica Especial relativa a alimentos e bebidas**, 24 de julho de 1978 –.

Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_78.pdf](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78.pdf) . Acesso em: 15 mar. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 12, de 02 de janeiro de 2001 – Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. In: **Diário Oficial da União**, seção 1. Brasília, 10 jan. 2001.

BRASIL. Instrução normativa nº 41 de 7 de junho de 2004. Dispõe sobre a validação da metodologia utilizada pelo sistema de detecção patogênica para alimentos e amostras ambientais – A-Bax® para detecção de *Salmonella* spp em amostras de alimentos, água e amostras ambientais – swabs, como método alternativo equivalente ao método de referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. In: **Diário Oficial da União**, seção 1. Brasília, 15 de junho de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº518 de 25 de março de 2004 – Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, 26/03/2004. In: SILVA, N.; NETO, R.C.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica da água**. Editora Varela, 2005.

BRASIL. Resolução SAA - s/nº, de 6 de março de 2006. Disponível em <http://www.in.gov.br/imprensa/in>. Acesso em 25 jul. 2006.

BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005.

BRIDSON, E.Y. **Manual Oxoid**, 1ª Edição, 2000.

CASTELL, G. **Larousse da Dieta e Nutrição**. São Paulo: Larousse Brasil, 2004

CASTILLO, A.; MERCADO, I.; LUCIA, L.M.; MARTINEZ-RUIZ, Y.; PONCE DE LEÓN, J.; MURANO, E.A.; ACUFF, G.R. *Salmonella* contamination during production of cantaloupe: a binational study. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 713-720, 2004.

CHAMBERS, R.M.; AIRD, H.; BOLTON, F.J. Waterborne *E. coli* O157. **Journal of Applied Microbiology**, Symposium Supplement, v. 88, p. 124 – 132, 2002

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2ª edição, Editora UFLA, Lavras, 2005.

CHITARRA, M.I.F. **Processamento Mínimo de Frutos e Hortaliças**. Viçosa: UFV, 1998. 88p.

CHRISTÓVAO, D.A. Contaminação da alface (*Lactuca sativa* L) por microrganismos de origem fecal. **Tese** para catedrático de Microbiologia e Imunologia Aplicada da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP, 1958.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Código de Práticas de Higiene para las Frutas y Hortalizas Frescas**. CAC / RCP 53, 2003. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.net/web/standard\\_list.do?lang=es](http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es). Acesso em: 23 jun. 2006

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Report of the Thirty-Fourth Session of the Codex Committee on Food Hygiene**. Alinorm 03/13, Appendix II, p. 45-63. Bangkok, Thailand, outubro 2001.

CURTIS, M.L.; FRANCESCHI, O.; DE CASTRO, N. *Listeria monocytogenes* en vegetales minimamente procesados. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, no. 3, p. 282-288, 2002.

DELAQUIS, P.; STEWART, S.; CAZAUX, S.; TOIVONEN, P. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* and *E. coli* O157:H7 in ready-to-eat iceberg lettuce washed in warm chlorinated water. **Journal of Food Protection**, v. 65, no. 3, p. 459-464, 2002.

DESMARCHELIER, P.M.; GRAU, F.H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A.D.; ARNOLD, G.; JINSON, I., et al.(ed). **Foodborne microorganisms of public health significance**. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc., 1997. Cap 7, p. 231-264.

**DIFCO Manual**. Difco Laboratories – Division of Becton Dickson and Company Sparks, Maryland – USA. 11<sup>th</sup> Edition, 1998.

DONELLY, C.W.; BRACKETT, S.; DOORES, S.; LEE, W.H., LOVETT, J. *Listeria*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4a. ed. American Public Health Association, Washington D.C., 2001, chapter 38, pg 637-663.

DOYLE, M.P.; ERICKSON, M.C. Forum: **The fecal coliform assay, the result of which have led to numerous misinterpretations over the years, may have outlived its usefulness**. *Microbe*, abril 2006. Disponível em: <http://www.asm.org/microbe/index.asp?bid=41848>. Acesso em: 04 jun. 2007.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4a. ed. American Public Health Association, Washington D.C., 2001.

DUFFY, G.; CLOAK, O.M.; SHERIDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; McDOWELL, D.A. The development of combined surface adhesion and polymerase chain reaction technique in the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. **Int. J. Food Microbiology**, Amsterdam, v. 49, p. 151-159, 1999.

DUFFY, E.A.; LUCIA, L.M.; KELLS, J.M.; CASTILLO, A.; PILLAI, S.D.; ACUFF, G.R. Concentration of *Escherichia coli* and genetic diversity and antibiotic resistant profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, packing shed equipment, and fresh produce in Texas. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 70 – 79, 2005.

DUPONT QUALICON. **Health Canada validates Dupont Qualicon BAX System for detecting *E. coli* O157:H7 in fruits, vegetables, dairy and other foods**. Disponível em: [http://www2.dupont.com/Qualicon/en\\_US/news\\_events/article20061218.html](http://www2.dupont.com/Qualicon/en_US/news_events/article20061218.html). Acesso em: 05 abr. 2007.

ERCOLANI, G.L. Bacteriological quality assessment of fresh-market lettuce and fennel. **Applied and Environmental Microbiology**, **31**; 847-852, 1976.

EVANS, D.J.; EVANS, D.G.; DUPONT, H.L. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined in human, bovine, chicken and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. **Infection and Immunity**, vol 23, pg 336-346, 1979.

FAO/WHO. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report.** In: Microbiological Risk Assessment Series nº 5. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2004

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**, v. 59, no. 10, p. 1091-1101, 1996.

FARBER, J.M.; SANDERS, G.W.; JOHNSTON, M.A. A survey for various foods for the presence of *Listeria* species. **Journal of Food Protection**, vol 52, nº 7, p456-458, 1989.

FENG, P.. Appendix I – Rapid Methods for Detecting Foodborne Pathogens. In: BAM. **Bacteriological Analytical Manual Online**. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a1.html>. Acesso em: 03 abr. 2007.

FERNANDES, A. **Teste reprova um terço dos vegetais higienizados.** Jornal O Estado de São Paulo, 12 de maio de 2004.

FRANCIS, G.A.; THOMAS, C; O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v.34, p. 1-22, 1999

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo, Atheneu, 2003.

FRANK, J.F.; K. TAKEUSHI.. Direct observation of *Escherichia coli* O157:H7 inactivation on lettuce leaf using confocal scanning laser microscopy. In: TUIJTELAARS, et al, (eds) Food Microbiology and Food safety into the next millenium. **Proceedings** of 17<sup>th</sup> International Conference of International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH), Vindhoven, The Netherlands, 13-17, September, 1999, pg 795-797, 1999

FRÖDER, H. **Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas.** Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Ciência dos Alimentos. São Paulo, 2005.

GELLI, D.S.; T. TACHIBANA; I.R. OLIVEIRA; C.Q.ZAMBONI; J.A.PACHECO; e N. SPITERI. Condições higiênico - sanitárias de hortaliças comercializadas no estado de São Paulo, Sp, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 39: 37-43, 1979

GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; GARDEA, A.A.; CUMAEA-NAVARRO, F. **Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados**, Editora Logiprint Digital, Guadalajara, México, 2005.

GUERRA, M.M; McLAUCHLIN, J.; BERNARDO, F.A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiology**, vol 18, p423-429, 2001.

GUO, X.; CHEN, J.; BRACKETT, R.E.; BEUCHAT, L.R. Survival of *Salmonella* on tomatoes stored at high relative humidity, in soil, and tomatoes in contact with soil. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 274-279, 2002.

HEALTH CANADA – Disponível em: [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt\\_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mflp\\_29e.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/res-rech/mflp_29e.pdf)., 2003. Acesso em: 15 abr. 2007.

HEDBERG, C.W.; MACDONALD, K.L.; OLSTERHOLM, M.T. Changing epidemiology of foodborne disease: a Minnesota perspective. **Clinical Infectious Disease**, v. 18, p. 671-682, 1994.

HEPBURN, N.F.; MACRAE, M.; OGDEN, L.D. Survival of *Escherichia coli* O157 in abattoir waste products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, p. 223-236, 2002.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganisms in foods 5. In: **Microbiological specifications of food pathogens**. Imprenta London: Black Academic & Professional, 1996.

IKEDO, R.P. Minimamente Processados em Restaurantes de Coletividades. Palestra apresentada no **IV Encontro Nacional sobre o Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças / I Simpósio Ibero-americano de Vegetais Frescos Cortados**. São Pedro, 2006.

IFT - Institute of Food Technologists– A report of the IFT for the Food and Drugs Administration (FDA) of the United States Department of Health and Human

Services. Analysis and Evaluation of Preventive Control Measures for the Control and Reduction / Elimination of Microbial Hazards on Fresh and Fresh-cut Produce. **Comprehensive Reviews in Science and Food Safety**, 2001.

**International Fresh-cut Produce Association**. Microbiology of fresh-cut produce, 1997.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – “Proporção da população por sexo”, 2000. Disponível em <http://www.ibge.gov.br> , Acessado em: 11 mai. 2006.

ISLAM, M.; DOYLE, M.P.; PHATAK, S.C.; MORGAN, J.; MILLNER, P.; JIANG, X. Fate os *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts and irrigation water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 2497-2592. 2004

ISLAM, M.; DOYLE, M.P.; PHATAK, S.C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Persistence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on leaf lettuce and parsley grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1365-1370, 2004a.

JACOMINO, A.P., ARRUDA, M.C.; MOREIRA, R.C.; KLUGE, R.A. Processamento Mínimo de frutas no Brasil. **Síposium “Estado actual del mercado de frutos y vegetales cortados en Iberoamérica”** San José, Costa Rica, 2004

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª edição, editora Artmed – Porto Alegre, 2005.

JIMENEZ, L.; SCALICI, C.; SMALLS, S.; BOSKO, Y.; IGNAR, R. PCR detection of *Salmonella typhimurium* in pharmaceutical raw materials and products contaminated with a mixed bacterial culture using the BAX System. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 55, no. 05, p. 286-289, 2001.

KUSHIDA, M. M. **Validação de métodos laboratoriais: avaliação do sistema BAX® de análise de *Salmonella* sp em alimentos por reação de polimerase em cadeia (PCR)**. Tese apresentada à Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do grau de doutor em Ciência dos Alimentos. Campinas, 2005.

LANDGRAF, M.; NUNES, T.P. Microbiologia em Frutas e Hortaliças Minimamente Processadas. *In: IV Encontro Nacional sobre o Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças / I Simpósio Ibero-americano de Vegetais Frescos Cortados*. São Pedro, 2006. p 60-67

LEGNANI, P.P.; LEONI, E. Effect of processing and storage conditions on the microbiological quality of minimally processed vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 1061-1068, 2004.

LIMING, S.H.; BHAGWAT, A.A. Application of a molecular beacon-real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, no. 02, p. 177-187, 2004.

MAISTRO, L.C. **Avaliação Microbiológica Visando a Utilização e Comparação de Métodos Rápidos e Convencionais em Vegetais Folhosos Minimamente Processados**. Tese para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos, apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 2006.

MAISTRO, L.C. Alface minimamente processada: uma revisão. **Revista de Nutrição**, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, v. 14, set/dez 2001.

MAMMINA, C.; CANNOVA, L.; OLIVERI, R.; CARFI PAVIA, S.; DIGAETONO, V.; DIPIAZZA, F.; NOSTASI, A. Antibiotic resistance of *Salmonella* isolates from sewage plant effluents in Sicily. **Proceedings of the International Symposium: Salmonella and Salmonellosis**, p. 515-516, 2002.

MARTINS, C.; FRÖDER, H.; SOUZA, K.L.O.; FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T. Ecologia Microbiana de vegetais folhosos minimamente Processados. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Florianópolis – SC, p154. 2003

**MERCK Microbiology Manual**, 12th Edition, Germany, 2005

MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T. et. al. Detection and control of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 51, p. 179-184, 1994

MORETTI, C.L.; PUSCHMANN, R. Processamento mínimo de hortaliças. *In: IV Encontro Nacional sobre o Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças / I Simpósio Ibero-americano de Vegetais Frescos Cortados*. São Pedro, 2006. p 234-239.

MUKHERJEE, A.; SPEH, D.; DICK, E.; DIEZ-GONZALEZ, F. Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 894 – 900, 2004.

NGUZ, K.; SHINDANO, J.; SAMAPUNDO, S.; HUYGHBAERT, A. Microbiological evaluation of fresh-cut organic vegetables produced in Zambia. **Food Control**, vol 16, pg 623-628, 2005.

OLSEN, S.J.; MacKINON, L.C.; GOULDING, J.S. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1993-1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 49 (SS01):1-51, 2000.

O'MAHONY, M; COWDEN, J.; SMYTH, B.; LYNCH, D; HALL, M.; ROWE, D.; TEARE, E.L.; TETTMAR, R.E.; COLES, A.M.; GILBERT, R.J.; KINGCOTT, E.; BARLETT, C.L.R. An outbreak of *Salmonella saint-paul* infection associated with beansprout. **Epidemiol. Infect.**, v. 104, p. 229-235, 1990.

PARISH, M.E.; BEUCHAT, L.R.; SUSLOW, T.V.; HARRIS, L.J.; GARRET, E.H.; FARBER, J.N; BUSTA, F.F. Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2 (Supplement), p.161-173, 2003

PHLS – PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE. **Outbreaks of *Salmonella typhimurium* DT 204b infection in England and Wales and elsewhere in Europe**. Disponível em: <http://www.phls.org.uk/publications/CDR00/cdr3900.pdf>., 2000. Acesso em: 25 jun. 2006.

PILON, L. Estabelecimento da vida útil de hortaliças minimamente processadas sob atmosfera modificada e refrigeração. **Dissertação** para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2003.

PINGULKAR, K.; KAMAT, A.; BONGIRWAR, D. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of

inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. **International Journal of Food Science and Nutrition**, vol 52, p15-23, 2001.

PINHEIRO, N.M.S.; FIGUEIREDO, E.A.T.; FIGUEIREDO, R.W.; MAIA, G.A.; SOUZA, P.H.M. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, no. 01, 2005.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L.E. Genus XXXIII. *Salmonella*. In: BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> Ed. Volume 2**. New York: Springer Science+Business Media Inc., 2005, pg 764-799.

PORTE, A.; MAIA, L.H. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. **Boletim CEPPA**, v. 19, nº01, p. 105-118, jan./jun., 2001.

PRAZAK, A.M.; MURANO, E.A.; IMELDA MERCADO, ACUFF, G.R. Prevalence of *Listeria monocytogenes* during production and postharvest processing of cabbage. **Journal of Food Protection**, v.65, no. 11, p. 1728-1734, 2002

PREVIDI, M.P. et al. **Minimally processed and frozen vegetables: microbiological quality and incidence of pathogens in commercial products**. International Food Safety News, vol 11 (5). 2002.

ROSA, O.O. **Microbiota Associada a Produtos Hortícolas Minimamente Processados Comercializados em Supermercados**. Tese para a obtenção do título de Doutor em Ciências dos Alimentos, apresentada à Universidade Federal de Lavras. 2002

ROSAS, L.; BAEZ, A. and COUTINO, M. Bacteriological quality of crops irrigated with waste water in the Xochimilco plots, Mexico City. **Applied and Environmental Microbiology**, 47: 1074-1079, 1984

ROVERSI, R.M.; MASSON, M.L. Qualidade da alface crespa minimamente processada acondicionada em atmosfera modificada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, no. 04, 2004.

RYSER, E.T. & DONNELLY, C.W. *Listeria*. In: DOWNES, F. P. & ITO, K. (eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4<sup>th</sup> ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 36, p.343-356.

SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; MITCHELL, R.T. Microbiological quality of open ready-to-eat salad vegetables: effectiveness of food hygiene training of management. **Journal of Food Protection**, vol 66, nº9, p1581-1586, 2003b.

SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; WARD, L.; GILLESPIE, I.A.; MITCHELL, R.T. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of Salmonellosis. **Journal of Food Protection**, v66, no 03, p. 403-409, 2003a.

SANDERSON, M.W.; GAY, J.M.; HANCOOK, D.D. et. al. Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, vol. 33, p. 2616-2619, 1995

SANT'ANA, A.; AZEREDO, D.P.; COSTA, M. Análise de perigos no processamento de vegetais. **Higiene Alimentar**, v. 16, no. 101, p. 80-84, 2002.

SATCHELL, F.B.; STEPHENSON, P.; ANDREWS, W.H.; ESTELA, L.; ALLEN, G. The survival of *Shigella sonnei* in shredded cabbage. **Journal of Food Protection**, v. 53, p. 558-562, 1990.

SATO, G.S.O mercado de hortaliças e frutas minimamente processadas no Brasil. **Trabalho apresentado na 18ª Reunião Anual do Instituto Biológico (RAIB)**, São Paulo, 2005

SCHLECH, W.F. Foodborne listeriosis. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 31, p. 770-775, 2000.

SHARMA, R.R.; DEMIRCI, A. ; BEUCHAT, L.; FEET, W.F. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on Inoculated Lima Seeds with Ozonated Water and heat treatment. **Journal of Food Protection**, 65 (3), 447-451, 2002.

SHEARER, A.E.; STRAPP, C.M.; JOERGER, R.D. Evaluation of polymerase chain reaction-based system for detection of *Salmonella enteritidis*, *E. coli* O157:H7,

*Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* on fresh fruits and vegetables. **Journal of Food Protection**, v. 64, no. 6, p. 788-795, 2001.

SILVA, E.O.; PUSCHMANN, R.; SOARES, N.F.F.; CARNELOSSI, M.A.G.; MORETTI, C.L.; CENCI, S.A. Processamento mínimo de hortaliças no Brasil. **Síposium “Estado actual del mercado de frutos y vegetales cortados en Iberoamérica”** San José, Costa Rica, 2004

SILVA JR., E.A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. Editora Varela, 5ª edição, São Paulo, 2002.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate**. Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos, 2002, Piracicaba. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/>. Acesso em: 07 set. 2006.

SILVA, M.P.; CAVALLI, D.R.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Avaliação do padrão de coniformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coniformes totais e *E.coli* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, no. 02, p. 352-359, 2006.

SILVA, N. ***E. coli* O157:H7 em alimentos**. Tese para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos, apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. 2004a.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos**, 2ª edição, Editora Varela, São Paulo, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.....**Manual de Métodos de análise microbiológica de alimentos**, Editora Varela, 2007, no prelo.

SILVA, N.; SILVEIRA, N.F.A., YOKOKA, F.; OKAZAKI, M.M. Ocorrência de *E. coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, no. 2, p. 167-173, 2003.

SILVEIRA, N.F.A.; BERBARI, S.; BLISKA, F. Efeito do uso do ozônio na água de lavagem para desinfecção de vegetais folhosos minimamente processados. Processo Fapesp 00/04677-5, **Relatório Final**, 03/02/2003.

SOLOMON, E.B.; PANG, H.J.; MATTHEWS, K.R. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce plants following Spray irrigation with contaminated water. **Journal of Food Protection**, v. 66, no. 12, p. 2198-2202, 2003.

SOLOMON, E.B.; POTENSKI, C.J.; MATTHEWS, K.R. Effect of Irrigation Method on Transmission to and Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce. **Journal of Food Protection**, v. 65, no. 4, p. 673-676, 2002.

SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTÓ, J.C.; MAÑES, J. *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. **Journal of Food Protection**, vol 64, nº4, p551-553, 2001.

SOUZA, R.A.M. Mercado para produtos minimamente processados. **Informações Econômicas**, vol. 31, nº 03. São Paulo, 2001

STAFFORD, R. ***Salmonella* entérica serotype Bovis-morbificans PT32 traced to iceberg lettuce**. Disponível em: ProMed Archives, [www.promedmail.org](http://www.promedmail.org), 2001. Acesso em: 23 jun 2006.

STEWART, D.; GENDEL, S.M. Specificity of the BAX polymerase chain reaction system for detection of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 81, no. 4, p. 817-822, 1998.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 2001. p 383 – 409.

SZABO, E.A.; SCURRAH, K.J.; BURROWS, J.M. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Letters in Applied Microbiology**, vol 30, p456 – 460. 2000.

TAORMINA, P.J.; BEUCHAT, L.R.; SLUTSKER, L. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. **Emergent Infect Diseases**, no. 5, p. 624-634, 1999.

TOURNAS, V.H. Moulds and Yeasts in fresh and minimally processed vegetables and sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 71-77, 2005.

WACHTEL, M.R.; WHITEHAND, L.C.; MANDRELL, R.E. Prevalence of *Escherichia coli* associated with a cabbage crop inadvertently irrigated with partially treated sewage wastewater. **Journal of Food Protection**, v.65, nº 3, p.471-475, 2002.

WANG, C.Y. Chilling Injury and Browning of Fresh-Cut Fruits and Vegetables. **In:IV Encontro Nacional sobre o Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças / I Simpósio Ibero-americano de Vegetais Frescos Cortados**. São Pedro, 2006. p 68-76.

ZEPEDA-LOPEZ, H.; ORTEGA-RODRIGUEZ, M.; QUINONEZ-RAMIREZ, E.I.; VAZGUEZ-SALINAS, C. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from vegetables. **Annual Meeting of the American Society of Microbiology (Abstracts)**, Washington D.C., 1995