

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DETECÇÃO DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO  
EXPANDIDO (ESBL) EM CEPAS DE COLIFORMES ISOLADOS  
DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS,  
COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE FORTALEZA-CEARÁ.**

**FRANCISCO AFRANIO CUNHA**

**FORTALEZA**

**2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DETECÇÃO DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO  
EXPANDIDO (ESBL) EM CEPAS DE COLIFORMES ISOLADOS  
DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS,  
COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE FORTALEZA-CEARÁ.**

**FRANCISCO AFRANIO CUNHA**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Ceará.

Fortaleza

2007

Esta Dissertação foi submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

---

**Francisco Afrânio Cunha**  
**(Mestrando)**

Dissertação aprovada em:

---

**Prof.Dr. Everardo Albuquerque Menezes**  
**Orientador**

---

**Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco**  
**Membro**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Maria Pontes Thé**  
**Membro**

---

**Prof. Dr. Benedito de Brito Cardoso**  
**Suplente**

**Este trabalho é dedicado à Conceição,  
minha esposa. Em todos esses anos juntos,  
seu amor tem sido meu escudo;  
sua coragem tem sido minha espada.  
Sem você nada teria sido possível.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me permitido realizar este sonho.

A minha família que entendeu minhas ausências prolongadas.

Ao Professor Everardo Albuquerque Menezes que me ajudou em todos os momentos da elaboração desse trabalho.

Aos alunos que me ajudaram: Lia Nascimento Amorim, Karla Pimenta Soares, José Gadelha Lima Neto, Kaline Medeiros Nascimento, Luana Guabiraba Mendes, sem eles O Laboratório de Microbiologia seria um lugar sem pessoas.

Aos meus colegas do Mestrado em Tecnologia de Alimentos.

Aos professores do Mestrado em Tecnologia de Alimentos pelos conhecimentos repassados.

Aos amigos do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará.

## SUMARIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b>	xiv
<b>ABSTRACT</b>	xv
<b>1.INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
2.1. Processamento mínimo de hortaliças.	19
2.2. Contaminação de hortaliças.	22
2.3. Principais Bactérias Envolvidas em Intoxicações Alimentares veiculadas por Hortaliças.	23
2.4. Importância das Enterobactérias em Hortaliças Minimamente Processadas.	25
2.5. Resistência Bacteriana entre Microrganismos de Origem Alimentar.	26
2.6. Enterobactérias e Enzimas Betalactamases de Espectro Expandido (ESBL).	27
2.7. Resolução RDC N° 12 de 2 de Janeiro de 2001.	29
<b>3.OBJETIVOS</b>	
3.1. Geral	30
3.2. Específicos	30
<b>4.MATERIAL E MÉTODOS</b>	
4.1. Coleta de amostras	31
4.2.Preparação das Amostras	31
4.3.Procedimentos microbiológicos	32

4.3.1. Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas	32
4.3.2. Contagem de Bolores e Leveduras	33
4.3.3. Teste de identificação de bolores - microcultivo	33
4.3.4. Teste Presuntivo para Coliformes	34
4.3.5. Teste confirmatório para Coliformes Totais	34
4.3.6. Teste confirmatório para Coliformes a 45°C	35
4.3.7. Presença de <i>Salmonella</i> spp	35
4.3.8. Identificação das Cepas Bacterianas	36
4.3.9. Testes de Sensibilidade a Antibióticos (TSA)	37

## 5. RESULTADOS

5.1. Contagem de Microrganismos Aeróbios Mesófilos.	38
5.2. Contagem de Bolores e Leveduras	39
5.3. Identificação de Bolores em Hortaliças Minimamente Processadas.	39
5.4. Número mais provável de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> em amostras de Hortaliças.	40
5.5. Perfil de sensibilidade a antibióticos de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de amostras de Hortaliças.	48
5.6. Perfil de sensibilidade a antibióticos de cepas de <i>K. pneumoniae</i> isoladas de amostras de Hortaliças.	51
5.7. Perfil de sensibilidade a antibióticos de cepas de <i>E. aerogenes</i> isoladas de amostras de Hortaliças.	54
5.8. Triagem para produção de ESBL por cepas <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e	57

*E. aerogenes* isoladas de amostras de Hortaliças.

<b>6.DISCUSSAO</b>	58
<b>7.CONCLUSÕES</b>	75
<b>8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	77
<b>ANEXOS</b>	88
ANEXO 1 - Diluições sucessivas	89
ANEXO 2 - Contagem padrão em placa	90
ANEXO 3 - Contagem de bolores e leveduras	91
ANEXO 4 - Técnica do Número mais Provável	92
ANEXO 5 - Técnica de Análise de <i>Salmonella</i>	93
ANEXO 6 – Hortaliças Minimamente Processadas	94
ANEXO 7 – Fotos de microcultivo de bolores isolados de hortaliças minimamente processadas.	95 110
ANEXO 8 - Fotos de bactérias isoladas de hortaliças minimamente processadas em meio EMB.	96
ANEXO 9 - Fotos dos testes de sensibilidade de bactérias isoladas de hortaliças minimamente processadas.	98
ANEXO 10 – Pontos de corte dos antibióticos utilizados nos testes de sensibilidade de bactérias isoladas de hortaliças minimamente processadas	100

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

HMP- Hortaliças minimamente processadas.

UFC – Unidade Formadora de Colônia.

ESBL - Betalactamase de Espectro Expandido.

Log – Logaritmo.

MIC – Concentração Inibitória Mínima.

EMB – Eosina Metileno Blue. Agar eosina azul de metileno.

TSA – Teste de Sensibilidade de Antibióticos.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fontes de microrganismos patogênicos contaminantes de hortaliças.	23
Tabela 2	Enterobactérias, responsáveis por surtos, isoladas de hortaliças.	26
Tabela 3	Contagem de microrganismos aeróbios mesófilos em hortaliças minimamente processadas.	38
Tabela 4	Contagem de Bolores e Leveduras em hortaliças minimamente processadas.	39
Tabela 5	Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>E.coli</i> e presença de <i>Salmonella</i> encontrados em acelga minimamente processada analisadas.	40
Tabela 6	Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>E.coli</i> e presença de <i>Salmonella</i> encontrados em alface minimamente processadas analisadas.	41
Tabela 7	Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>E.coli</i> e presença de <i>Salmonella</i> encontrados em tomate cereja minimamente processado analisados.	42
Tabela 8	Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>E.coli</i> e presença de <i>Salmonella</i> encontrados em repolho roxo e repolho verde minimamente processada analisadas.	43
Tabela 9	Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>E.coli</i> e presença de <i>Salmonella</i> encontrados em cenoura e vagem minimamente processada analisadas.	44
Tabela 10	Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>E.coli</i> e presença de <i>Salmonella</i> encontrados em cenoura ralada minimamente processada analisadas.	45
Tabela 11	Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>E.coli</i> e presença de <i>Salmonella</i> encontrados em cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo minimamente processada analisadas.	45

Tabela 12	Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>E.coli</i> e presença de <i>Salmonella</i> encontrados em saladas minimamente processada analisadas.	46
Tabela 13	Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, <i>E.coli</i> e presença de <i>Salmonella</i> encontrados em coentro cebola e salsa picadas minimamente processada analisadas.	47
Tabela 14	Perfil de sensibilidade de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de hortaliças minimamente processadas.	49
Tabela 15	Perfil de sensibilidade de cepas de <i>K. pneumoniae</i> isoladas de hortaliças minimamente processadas.	52
Tabela 16	Perfil de sensibilidade de cepas de <i>E. aerogenes</i> isoladas de hortaliças minimamente processadas.	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas do Processamento Mínimo.	21
Figura 2	Bolores isolados e identificados em hortaliças minimamente processadas.	40
Figura 3	Resultados das análises microbiológicas das amostras de hortaliças minimamente processadas para o parâmetro coliforme a 45°C.	48
Figura 4	Percentual de sensibilidade e resistência a antimicrobianos das cepas de <i>E. coli</i> isoladas de hortaliças minimamente processadas.	50
Figura 5	Mono e multiresistência de cepas de <i>E. coli</i> isoladas de hortaliças minimamente processadas.	50
Figura 6	Tipos de associações de resistência a drogas antimicrobianas mais comumente encontradas em cepas de <i>E. coli</i> isoladas de hortaliças minimamente processadas.	51
Figura 7	Percentual de sensibilidade e resistência a antimicrobianos das cepas de <i>K. pneumoniae</i> isoladas de hortaliças minimamente processadas.	53
Figura 8	Mono e multiresistência de cepas de <i>K. pneumoniae</i> isoladas de hortaliças minimamente processadas.	53
Figura 9	Tipos de associações de resistência à drogas antimicrobianas mais comumente encontradas em cepas de <i>K. pneumoniae</i> isoladas de hortaliças minimamente processadas.	54

- Figura 10 Percentual de sensibilidade e resistência a antimicrobianos das *E. aerogenes* isoladas de hortaliças minimamente processadas frente aos antibióticos testados. 56
- Figura 11 Mono e multiresistência de *E. aerogenes* isoladas de hortaliças minimamente processadas. 56
- Figura 12 Tipos de associações de resistência à drogas antimicrobianas mais comumente encontradas em cepas de *E. aerogenes* isoladas de hortaliças minimamente processadas. 57

## RESUMO

Hortaliças minimamente processadas (HMP) normalmente consistem de hortaliças frescas, cruas, lavadas, descascadas, cortadas, sanitizadas, centrifugadas, empacotadas e acondicionadas sob refrigeração. Hortaliças são potenciais veículos de microrganismos que podem estar associadas à doenças transmitidas por alimentos. Inúmeras são as causas para a presença de elevada carga microbiana nesse tipo de produto, entre as quais estão: as técnicas de cultivo, armazenamento, transporte e distribuição para consumo, a prática do uso de adubo orgânico, a utilização de água contaminada para irrigação, o transporte realizado em engradados abertos e as condições de higiene no manuseio e preparo de refeições, principalmente quando tais alimentos são consumidos crus. O objetivo desse estudo foi determinar a presença de Enzimas Betalactamases de Espectro Expandido (ESBL) em cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de HMP comercializadas na cidade de Fortaleza e verificar se as hortaliças analisadas atendem a RDC N° 12 de 02 de janeiro de 2001, que rege o padrão microbiológico dos alimentos no Brasil. Foram coletadas 80 amostras de HMP comercializadas em Fortaleza. As hortaliças estudadas foram: 8 amostras de acelga; 10 alface; 8 tomate cereja; 8 repolho roxo, repolho verde; 10 cenoura e vagem; 8 cenoura ralada; 10 cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo; 10 saladas; 8 coentro, cebola e salsa picados. As análises foram realizadas de abril de 2006 a maio de 2007. As contagens de microrganismos aeróbios mesófilos variaram de 5,60 a 13,35 log UFC/ g de HMP. As contagens de bolores e leveduras variaram de 5,54 a 9,88 log UFC/ g de HMP. A contagem de coliformes totais e coliformes a 45°C foram bastante elevadas. O principal bolor isolado e identificado foi o *Penicillium* spp. Todas as amostras de acelga, cenoura ralada, cenoura e vagem, cenoura ralada, repolho roxo e repolho verde, coentro e salsa picados encontravam-se impróprias para o consumo, pois apresentaram quantidades superiores a 100 coliformes a 45°C/g de amostra. Das amostras de alface 50% apresentavam contagem de coliformes a 45°C acima do permitido pela legislação. Dos tomates cereja analisados 75% estavam dentro padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira, para coliforme a 45°C. Das amostras de repolho roxo, repolho verde 87% estavam com contagem de coliformes acima do permitido. Das amostras de salada 80% estavam fora dos padrões. Não foram detectadas *Salmonellas* nas amostras de HMP analisadas. As principais cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas foram *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. aerogenes*. Todas as cepas de *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* foram resistentes à ampicilina. Foram detectadas cepas de *E. coli*, *K pneumoniae* e *E aerogenes* com multiresistência aos antibióticos testados. Não foi observada resistência a ciprofloxacina, ceftazidima e imipenem. Não foram detectadas amostras de enterobactérias produtoras de ESBL. Não foram identificadas cepas de *E. coli* O15:H7 entre as cepas de *E. coli* isoladas de HMP. As condições higiênico-sanitárias desses produtos podem ser melhoradas com a aplicação de Boas Práticas em toda a cadeia produtiva.

**Palavras-Chave:** Hortaliças minimamente processadas. *Enterobacteriaceae*. Resistência a antimicrobianos. ESBL.

## ABSTRACT

Minimally processed vegetables (MPV) normally consist of fresh raw vegetables, washed, peeled, cut, disinfected, centrifugal dried packed and kept under refrigeration. Vegetables are potential vehicle of microorganisms that can be associated to the outbreaks of foodborne. Countless are the causes for the presence high microbial load in that product type, among which are: the cultivation techniques, storage, transport and distribution for consumption, the practice of the use of organic fertilizer, the use of polluted water for irrigation, the transport accomplished in open crates and the hygiene conditions in the handling and preparation of meals, mainly when such foods are consumed raw. The objective of this study was to determine the presence of extended-spectrum  $\beta$ -betalactamases (ESBL) in strains of *Enterobacteriaceae* isolated of MPV marketed in the city of Fortaleza and to verify if the analyzed vegetables assists the Brazilian Food Sanitation Standard, RDC N° 12, 02 of January 2001. 80 samples of MPV were collected marketed in Fortaleza. Were collected vegetables studied: 8 samples beet; 10 lettuce; 8 of cherry-colored tomato; 8 purple cabbage, green cabbage; 10 carrot and green bean; 8 grated carrot; 10 grated carrot, green cabbage and purple cabbage; 10 salads; 8 cilantro, onion and parsley pricked. The analyses were accomplished of April from 2006 to May of 2007. The countings of mesophiles aerobic, varied from 5,60 to 13,35 log UFC / g of MPV. The countings of moulds and yeasts, varied from 5,54 to 9,88 log UFC / g MPV. The counting of total coliforms and fecal coliforms were quite high. The main isolated and identified mold was the *Penicillium* spp. All of the beet samples, grated carrot, carrot and green bean, grated carrot, purple cabbage and green cabbage, cilantro and parsley pricked met inappropriate for the consumption, because they presented amounts superior of 100 fecal coliforms / g samples. Of the samples of lettuce 50% they presented fecal coliforms counting above legislation. Of the tomatoes cherry analyzed 75% were inside patterns of the Brazilian legislation, for fecal coliforms. Of the samples of purple cabbage, green cabbage 87% were with fecal coliforms counting above. Of the samples of salad 80% were out of the patterns. *Salmonellas* were not detected in the samples of MPV analyzed. The main isolated *Enterobacteriaceae* were *E. coli*, *K. pneumoniae* and *E. aerogenes*. All of the strains of *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* were resistant to the ampicillin. Strains of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* with multidrug resistance were detected. Resistance to ciprofloxacin, ceftazidime and imipenem was not observed. *Enterobacteriaceae* samples producing of ESBL were not detected. Were not identified strains of *E. coli* O15:H7 among the strains of *E. coli* isolated of MPV. The hygienic-sanitary conditions of those products can be improved with the application of Good Practices in the whole productive chain.

**Keywords:** Minimally processed vegetables. *Enterobacteriaceae*. Antibiotic resistance. ESBL.

## 1. INTRODUÇÃO

Há uma tendência para o uso de alimentos cada vez mais naturais, valorizando o sabor original dos produtos, onde o consumidor prima pela qualidade, principalmente às relacionadas com o valor nutritivo, as condições higiênico-sanitárias e as características sensoriais, portanto novas tecnologias estão sendo desenvolvidas no processamento de alimentos (LIMA et al., 2003).

Além da qualidade sensorial, a qualidade microbiológica e a segurança das hortaliças frescas precisam ser garantidas e são dependentes da microbiota presente na matéria-prima (FANTUZZI et al., 2004).

O consumo de verduras cruas constitui importante meio de transmissão de várias doenças. A contaminação da hortaliça pode ocorrer na horta, resultante da utilização de água de irrigação ou uso de adubos inadequados, no transporte ou por manipulação nos pontos de venda. As sucessivas manipulações aumentam as chances de contaminação (TAKAYANAGUI et al., 2001).

As doenças veiculadas por alimentos são resultantes predominantemente do ciclo de contaminação fecal/oral e seu controle tem recebido atenção cada vez maior em todo o mundo (JAY, 2005).

No Brasil são escassos os trabalhos avaliando a qualidade microbiológica das hortaliças consumidas pela população (TAKAYANAGUI et al., 2001).

Nos Estados Unidos os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos de infecção alimentar no período de 1993 a 1997, foram carne bovina (25%) e frutas, saladas e hortaliças (20%) (OLSEN, 2004).

A resolução RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 do Ministério da Saúde estabelece um limite de tolerância para hortaliças minimamente processadas, para

coliformes a 45°C de até 100 UFC/ g do produto e ausência de *Salmonella* sp em 25 g de amostra (BRASIL, 2001).

Em países em desenvolvimento, o principal método de disseminação de *Salmonellas* spp. ocorre através de alimentos contaminados (YATES & AMEYS, 2005).

Bactérias resistentes a antibióticos ou seus determinantes de resistência são conhecidos por se disseminarem de animais para humanos via cadeia alimentar (BOEHME et al., 2004)

As Enzimas Betalactamases de Espectro Expandido (ESBL) foram identificadas inicialmente na Europa no início da década de 80, no presente momento encontram-se distribuídas em todo o mundo. As ESBL são enzimas encontradas em cepas de Enterobactérias principalmente *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Proteus mirabilis* (PATERSON, 2000). A prevalência dessas cepas produtoras de ESBL no Brasil é desconhecida.

Nos últimos anos têm se observado uma elevada diversidade de ESBL e uma dramática elevação da prevalência de portadores assintomáticos de cepas produtoras de ESBL. Esses fatos demonstram a importância do trato intestinal humano como um reservatório para cepas produtoras de ESBL. Enterobactérias produtoras de ESBL podem provocar sérias infecções de difícil controle farmacológico, dentre elas: infecção urinária, peritonite, colangite, abscessos intra-abdominais, septicemia etc (PATERSON, 2000).

A detecção de Enterobactérias produtoras de ESBL é de grande importância por três razões: primeira, pode ocorrer a transferência horizontal de genes que codificam ESBL de organismos produtores de ESBL para organismos não produtores. Segunda, as

infecções produzidas por esses organismos não devem ser tratadas com cefalosporinas e terceiro, infecções desse tipo devem ser tratadas com carbapenemas (imipenem, meropenem e ertapenem) (BRADFORD, 2001).

Os plasmídios que transportam a informação para a ESBL transportam também informações para outras formas de resistência, conferindo a cepa bacteriana, que recebe o plasmídio, a multiresistência (SHEN et al., 2001).

Os alimentos representam um importante veículo de transmissão de doenças, principalmente quando manipulados de forma inadequada e cultivados com água contaminada. Alimentos contaminados com cepas produtoras de ESBL ao serem ingeridos podem não causar um dano imediato a não ser uma gastroenterite, no entanto, a cepa produtora de ESBL pode colonizar o intestino e transmitir por conjugação os genes que codificam essas enzimas. Crianças e idosos que se alimentam de dietas com hortaliças estão mais sujeitos a ação desses microrganismos patogênicos. O indivíduo que possui essa cepa funciona como reservatório contribuindo para a persistência dessa cepa na natureza. No futuro esse indivíduo pode apresentar uma infecção de difícil controle quimioterápico, pois estes microrganismos são extremamente resistentes a antibióticos.

Para combater a cadeia de transmissão se faz necessário compreendê-la. Pouco se sabe do papel das hortaliças minimamente processadas nessa cadeia de transmissão. Detectar alimentos que possam estar envolvidos com essa cadeia transmissão é de vital importância para a quebra da cadeia.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Processamento Mínimo de Hortaliças**

O processamento mínimo de hortaliças é definido como qualquer alteração física causada em hortaliças que mantém o estado fresco desses produtos. Incluem operações de seleção, lavagem, corte, sanitização, centrifugação, embalagem, armazenamento e comercialização (MORETTI, 1999). (Figura 1).

O processamento mínimo de hortaliças é um empreendimento voltado para a verticalização da produção agrária, proporcionando agregação de valor, ou seja, melhor preço para a comercialização do produto. O valor agregado desses produtos melhora a competitividade do setor de horticultura, proporcionando novos canais de comercialização e escoamento da produção, através dos quais se espera importante impacto econômico e social pela redução das perdas, pela geração de renda ao produtor e, principalmente, pela geração de empregos, tanto diretos como indiretos. Para enfrentar esta nova realidade, o mercado de hortaliças precisa estar atento para atender todos os tipos de consumidores, oferecendo hortaliças *in natura* e aquelas desenvolvidas sob medida para serem convenientes: menor tempo de preparo e com alto valor agregado, ou seja, minimamente processadas (FANTUZZI et al., 2004; SILVA et al., 2005).

Por questões de custo, comodidade e higiene, as empresas que trabalham com alimentação (restaurantes com sistema de comida a quilo, restaurantes tradicionais, cozinhas industriais e empresas de catering), bem como hospitais, clínicas e escolas, estão procurando utilizar vegetais (frutas e hortaliças) minimamente processados. A tecnologia de processamento mínimo é um método que estende a vida de prateleira de

alimentos, permitindo sua melhor distribuição. Essa tecnologia encontra demanda de consumo pela conveniência e pela qualidade (OHLSSON, 1994).

Produtos minimamente processados devem, basicamente, apresentar frescor característicos do produto *in natura*, mostrar qualidade consistente através da embalagem, estar razoavelmente livre de defeito e não podem ser conservados com aditivos químicos (CANTWELL, 1992; NGUYEN-THE e CARLIN, 1994).

Os produtos minimamente processados, conhecidos como fresh cut, têm-se destacado no mercado, pois seguem a tendência mundial de consumo de alimentos saudáveis, frescos e de alta qualidade. O propósito do seu fornecimento é o de disponibilizar um produto pronto para usar, que não requeira nenhuma preparação posterior significativa por parte do consumidor, em termos de seleção, limpeza, lavagem ou cortes (JUNQUEIRA E LUENGO 2000).

Processos de redução do tamanho, tais como o corte e o fatiamento, que dão ao consumidor a conveniência do prato preparado, e que são uma das características diferenciadoras dos produtos minimamente processados em relação aos alimentos *in natura*, podem favorecer em muito o crescimento microbiano (SILVA et al., 2003).

O processamento de hortaliças e frutas tem se tornado uma área potencial de desenvolvimento e de possibilidade de agregação de valor aos produtos agrícolas (LIMA et al., 2005).

Os consumidores desses produtos são supermercados, hotéis, restaurantes, fast-food, além da população, principalmente as que desejam praticidade e aquelas que dispõem de pouco tempo para preparar os alimentos (TEIXEIRA, 2001).

As hortaliças minimamente processadas possuem tempo de prateleira menor que hortaliças inteiras (BONNAS et al., 2003).

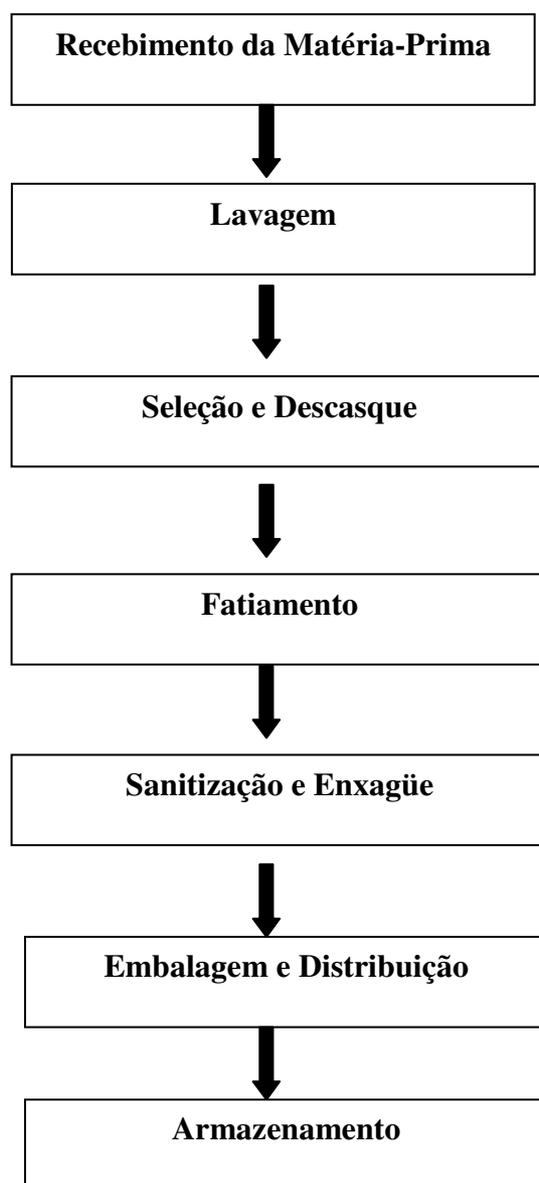


Figura 1: Etapas do Processamento Mínimo de Hortaliças

Com a crescente industrialização e urbanização mundial ocorreram profundas mudanças nas relações sociais e de trabalho o que fez aumentar o número de pessoas que fazem suas refeições fora de casa ou que tem pouco tempo para prepará-las. A partir deste cenário, o mercado institucional e mesmo o consumidor doméstico têm buscado alimentos que reúnam fácil preparo, qualidade e alto valor nutritivo. O produto

minimamente processado atende a esses requisitos e, por isso, a sua demanda e produção vem crescendo rapidamente (SCHLIME e ROONEY, 1994).

As mudanças no perfil do consumidor, interessando em alimentação mais saudável, sem, contudo, abrir mão da conveniência e praticidade proporcionadas pelos alimentos prontos, tem conduzido ao desenvolvimento de novas tecnologias, dentre as quais se destaca o processamento mínimo (ANTONIOLLI et al., 2005).

A comercialização de hortaliças minimamente processadas é um mercado crescente, devido a praticidade que elas oferecem (SOUZA, 2001). Contudo a manutenção da qualidade destes produtos durante a armazenagem ainda é um dos principais obstáculos na conquista de novos mercados (SARANTÓPOULOS et al., 2002).

O processamento mínimo de frutas e hortaliças no Brasil é ainda recente, mas apresenta-se como um nicho de mercado em crescimento. É um produto com maior valor agregado quando comparado às frutas e hortaliças compradas *in natura*. Apresenta ainda vantagens para o consumidor como a conveniência e 100% de aproveitamento do produto adquirido (SATO, 2005).

Os itens frescor, refrigeração inadequada e contaminação microbiana totalizam 55,6% das preocupações dos consumidores de produtos minimamente processados (TEIXEIRA et al., 2001).

## **2.2. Contaminação de Hortaliças**

Hortaliças são potenciais veículos de microrganismos que podem estar associadas à toxiinfecções alimentares e, conseqüentemente, a doenças transmitidas por alimentos (DTA). Inúmeras são as causas para a presença de elevada carga microbiana

nesse tipo de produto, entre as quais estão: as técnicas de cultivo, armazenamento, transporte e distribuição para consumo, a prática do uso de adubo orgânico, a utilização de água contaminada para irrigação, o transporte realizado em engradados abertos e as condições de higiene no manuseio e preparo de refeições, principalmente quando tais alimentos são consumidos crus (PACHECO et al., 2002). A Tabela 1 descreve os principais eventos onde pode ocorrer a contaminação.

Tabela 1: Fontes de microrganismos patogênicos contaminantes de hortaliças.

<b>Antes da colheita</b>	<b>Pós-Colheita</b>
Fezes	Fezes
Solo	Manejo humano
Água de irrigação	Equipamento de colheita
Água para aplicar inseticidas	Depósitos de transporte
Aubos	Animais
Animais	Insetos
Insetos	Água de lavagem
Manejo humano	Processamento
	Gelo
	Veículos de transporte
	Estocagem imprópria
	Contaminação cruzada

Fonte: BRACKETT, 1994.

A lavagem em água corrente de boa qualidade pode reduzir em até 90% a carga microbiana das hortaliças, porém, não é suficiente para manter a contaminação em níveis seguros, sendo essencial a aplicação de uma etapa de desinfecção com agentes antimicrobianos (NASCIMENTO et al., 2003).

### **2.3.Principais Bactérias Envolvidas em Intoxicações Alimentares Veiculadas por Hortaliças.**

Durante o processamento os sanitizantes podem ajudar, mas não garantem completa eliminação de patógenos. As condições as quais os produtos são expostos

durante a distribuição podem ter profundos efeitos na segurança microbiológica dos mesmos (BRACKETT, 1999).

A atividade microbiana em hortaliças minimamente processados pode ser influenciada pelo metabolismo do tecido da planta, pela atmosfera modificada, pela permeabilidade do filme de embalagem e pela temperatura de estocagem (FANTUZZI et al., 2004)

O efeito do processamento e condições de estocagem na sobrevivência e crescimento de microrganismos patogênicos em hortaliças e frutas minimamente preparadas é um problema de saúde pública. O corte das hortaliças pode provocar a exsudação de fluidos contendo nutrientes, fitoalexinas e outras substâncias antimicrobianas que podem aumentar ou retardar o crescimento da microbiota natural ou de patógenos (PORTE e MAIA, 2001).

As hortaliças cruas são bons substratos para o crescimento de patógenos (ACEVEDO et al., 2001).

Frutas e hortaliças frescas têm sido identificados como veículos de bactérias patogênicas relevantes para saúde pública, podendo transmitir doenças causadas por *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7, além de protozoários, helmintos e vírus (JAY, 2005).

Microrganismos capazes de causar doenças em seres humanos como a *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella spp*, tem sido isoladas de alface e saladas (FRANCYS, et al., 1999).

Os sorotipos de *Salmonella spp* são estimados como responsáveis por cerca de 1,5 milhões de casos de infecção alimentar a cada ano com 15.000 hospitalizações e 500 mortes. Alimentos de origem animal são comumente associados como veículos de

*Salmonella* sp, entretanto, salmonelose também tem sido associada com o consumo de tomates, brotos de hortaliças, melões, suco de maçã e suco de laranja (MEAD et al., 1999).

Espécies de *Aeromonas* sp têm sido reconhecidos como patógeno emergente de origem alimentar. *Aeromonas* sp podem estar presentes em peixes, carnes e hortaliças frescas. Muitas espécies de microrganismos que estão presentes em alimentos são psicrotóxicas como a *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *Y. enterocolitica* e podem crescer durante a estocagem sob refrigeração (ISONHOOD e DRAKE, 2002; SZABO et al., 2000).

É difícil eliminar todos os patógenos de hortaliças minimamente processadas. A chave para minimizar os riscos associados com a presença de patógenos são: estrita aderência a boas práticas de manufatura e sanitização, efetivo controle de temperatura durante a distribuição e seleção de filmes apropriados para estocagem ( SZABO et al., 2000).

A indústria de alimentos ainda necessita de alternativas tecnológicas para proporcionar ao consumidor hortaliças e frutas minimamente processadas e seguras aos consumidores (LADO e YOUSEF, 2002).

#### **2.4.Importância das Enterobactérias em Hortaliças Minimamente Processadas**

A ingestão de hortaliças cruas contaminadas com Enterobactérias tem sido reportada com frequência (NASCIMENTO e MARQUES, 1998; PACHECO et al., 2002; SIQUEIRA et al., 1997). A Tabela 2 mostra surtos de doenças causadas por Enterobactérias isoladas de hortaliças.

Tabela 2: Enterobactérias, responsáveis por surtos, isoladas de hortaliças.

Hortalças	Pais	Enterobactéria
Repolho	México	<i>E. coli</i> O157:H7
	Espanha	<i>Salmonella</i>
Couve-flor	Holanda	<i>Salmonella</i>
Alface	Itália	<i>Salmonella</i>
	Holanda	<i>Salmonella</i>
	Espanha	<i>Salmonella</i>
Salsa	Egito	<i>Shigella</i>
Salada verde	Egito	<i>Salmonella</i>
Salada de hortalças	Egito	<i>Shigella</i>

Fonte: BEUCHAT, 2002.

A contaminação de saladas de hortalças com *E. coli* O157:H7 pode ocorrer durante a preparação de alimentos principalmente quando estão envolvidos alimentos cárneos. Outra fonte de contaminação de hortalças com *E. coli* O157:H7 pode ser devido a utilização de água de irrigação e adubos contaminados (SILVA et al., 2003).

## 2.5. Resistência Bacteriana entre Microrganismos de Origem Alimentar

Muitas infecções bacterianas de origem alimentar são responsáveis por uma diarreia auto-limitada que não requer tratamento com antibióticos, infecções sistêmicas incluindo bacteremia, podem ocorrer, particularmente em pacientes imunodeprimidos. Quando infecções espalham-se através do trato gastrointestinal, antibioticoterapia apropriada é necessária e pode salvar a vida do paciente. Muitos patógenos de origem alimentar têm desenvolvido resistência aos antimicrobianos e o tratamento de infecções severas encontra-se comprometido. A administração de antibióticos em doses sub-terapêuticas, como promotores de crescimento, a animais tem favorecido a disseminação de organismos resistentes (MENG e DOYLE, 2002).

Resistência a drogas por parte de bactérias entéricas isolados de alimentos é uma conseqüência inevitável do uso de drogas antimicrobianas na produção de alimentos (THREFALL et al., 2000).

A resistência antimicrobiana tem aumentado dramaticamente durante a última década entre patógenos de origem alimentar incluindo: *L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, *Y. enterocolitica*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*.. Embora existam diversos trabalhos científicos sobre o tema os aspectos do desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana permanece obscuro (MENG e DOYLE, 2002).

O aumento da incidência da resistência a antibióticos entre espécies de *Salmonella* em todo o mundo tornou-se um desafio e é imperativo que nós tenhamos conhecimentos sobre este fenômeno da resistência bacteriana e como limitar seus efeitos negativos nos alimentos (WHITE et al., 2002).

## **2.6. Enterobactérias e Enzimas Betalactamases de Espectro Expandido (ESBL)**

Enzimas betalactamases de espectro expandido (ESBL) são estruturas especializadas em destruir antibióticos betalactâmicos, dentre eles: ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima e cefepime. Esses antibióticos foram desenvolvidos para serem resistentes a betalactamases, no entanto, esse objetivo não conseguiu ser atingido. Essas enzimas podem estar presentes em Enterobactérias, principalmente *Klebsiella* sp, *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacter spp*. Bactérias que podem sintetizar essas enzimas apresentam uma vantagem sobre outras bactérias e podem se disseminar. Desde 1983, organismos produtores de ESBL têm sido isolados em todo mundo. Os danos causados por ESBL são devidos principalmente ao fato que elas podem ser passadas através de plasmídios para outras bactérias. No grupo de coliformes temos bactérias do gênero *Klebsiella*, principalmente *Klebsiella pneumoniae*, essa bactéria pode ser portadoras de genes que codifique ESBL. A bactéria *E. coli*, também pode carregar

genes para síntese de ESBL. Essas bactérias portadoras dessas enzimas podem estar presentes em alimentos, juntamente com outras bactérias do grupo coliforme. Os alimentos podem constituir um elo importante na cadeia de transmissão dessas cepas de bactérias (BRADFORD, 2001; NOVAK et al., 2001).

O tratamento farmacológico de cepas de bactérias produtoras de ESBL é bastante reduzido no Brasil. Temos disponíveis apenas três fármacos para o combate dessas cepas, o imipenem o meropenem e o ertapenem, que são classificados como antimicrobianos da classe das carbapenemas (NIISSEN et al., 2004).

Os alimentos representam um importante veículo de transmissão de doenças, principalmente quando manipulados de forma inadequada e cultivados com água contaminada. O alimento que se ingere hoje pode ser o responsável pela doença de amanhã (YATES e AMYES, 2005).

O exame rotineiro de alimentos para detecção de uma numerosa série de microrganismos patogênicos é impraticável para a maioria dos laboratórios, devido a isso são procurados os microrganismos indicadores. Esses microrganismos apontam para a presença de microrganismos patogênicos. Detectar cepas bacterianas produtoras de ESBL pode funcionar como microrganismos indicadores, o que tornariam o alimento potencialmente perigoso para o consumo. Para combater a cadeia de transmissão se faz necessário compreendê-la. Pouco se sabe do papel das hortaliças minimamente processadas nessa cadeia de transmissão. Detectar esses alimentos que possam estar envolvidos com essa cadeia transmissão é de vital importância para a quebra da cadeia.

## **2.7. Resolução RDC N° 12 de 2 de Janeiro de 2001.**

A resolução RDC N° 12 de 2 de Janeiro de 2001 estabelece os limites permitidos de microrganismos presentes nos alimentos comercializados no Brasil. Para cada grupo de alimentos são designados os tipos de microrganismos importantes para aquele grupo de alimentos. A resolução define o número mínimo e número máximo de microrganismos presentes em cada lote do referido alimento. A resolução RDC n°12, de 2 de janeiro de 2001 do Ministério da Saúde estabelece um limite de tolerância para hortaliças minimamente processadas, para coliformes a 45°C de até 100 UFC/ g do produto e ausência de *Salmonella* sp em 25 g de amostra (BRASIL, 2001).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

- Determinar a presença de Enzimas Betalactamases de Espectro Expandido em cepas de Enterobactérias isoladas de hortaliças minimamente processadas comercializadas na cidade de Fortaleza.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar se as hortaliças analisadas atendem a RDC N° 12 de 02 de janeiro de 2001.
- Quantificar bactérias aeróbicas mesófilas presentes em hortaliças minimamente processadas.
- Quantificar bolores e leveduras presentes em hortaliças minimamente e identificar as principais espécies de bolores presentes.
- Avaliar a presença e determinar o número mais provável de coliformes totais , coliformes a 45°C, o número mais provável de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp presentes em hortaliças minimamente processadas.
- Avaliar a presença de presentes em hortaliças minimamente processadas.
- Isolar e identificar através de provas bioquímicas os coliformes a 45°C presentes em hortaliças minimamente processadas.
- Determinar o perfil de sensibilidade a antibióticos de cepas de coliformes: *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* isolados de hortaliças minimamente processadas a antimicrobianos.
- Pesquisar a presença de cepas produtoras de betalactamases de espectro expandido dentre as cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Coleta das amostras**

Foram coletadas 80 amostras de hortaliças minimamente processadas comercializadas em Fortaleza. As hortaliças estudadas foram: 8 amostras AC – Acelga; 10 amostras de AF - alface; 8 de TC - tomate cereja; 8 de RRRV – repolho roxo, repolho verde; 10 de CV – cenoura e vagem; 8 de CR – cenoura ralada; 10 de CRRVRR – cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo; 10 de SAL – saladas; 8 de CCSP – coentro, cebola e salsa picados. As amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Fortaleza. Todas as amostras analisadas estavam dentro do prazo de validade. As amostras foram transportadas em sacos plásticos devidamente identificados acondicionados em caixas térmicas, contendo gelo, até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Ceará. As análises foram realizadas em até uma hora após a chegada das amostras. As análises foram realizadas de abril de 2006 a maio de 2007.

### **4.2.Preparação das Amostras**

Foram pesados assepticamente 25,0 g da amostra e homogeneizado com 225,0 mL de água peptonada salina 1% estéril, após a homogeneização, a amostra foi colocada em um recipiente estéril e colocada em estufa a 37 °C por 24 h, esse procedimento foi realizado para pesquisa de *Salmonella* spp. Da mesma amostra foram retirados assepticamente 25,0 g e homogeneizado com 225,0 mL de água peptonada salina 0,1% estéril, esta diluição corresponde a  $10^{-1}$ , ou seja, 25,0 mL do homogeneizado contém um grama da amostra. A partir dessa diluição foram preparadas diluições sucessivas. A partir da diluição inicial, a diluição  $10^{-2}$  foi realizada retirando-

se 1,0 mL da diluição inicial para 9,0 mL do diluente (água peptonada salina 0,1%); a diluição  $10^{-3}$  foi preparada retirando-se 1,0 mL da diluição  $10^{-2}$  para 9,0 mL do diluente, a diluição  $10^{-4}$  foi preparada retirando-se 1,0 mL da diluição  $10^{-3}$  para 9,0 mL do diluente, observando-se sempre o uso do mesmo diluente. Foram realizadas diluições até  $10^{-4}$  para a determinação do número mais provável de coliformes totais e coliformes a  $45^{\circ}\text{C}$  e até  $10^{-10}$  para contagem de aeróbios mesófilos e bolores e leveduras. Estas diluições foram usadas para posteriores procedimentos microbiológicos (ANEXO 1) (SILVA et al., 1997, SOARES e MAIA, 1999).

### **4.3.Procedimentos microbiológicos**

#### **4.3.1.Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas**

Para a análise de bactérias aeróbias mesófilas, que são microrganismos que crescem em aerobiose e em uma temperatura média de  $35^{\circ}\text{C}$ , foram pipetadas alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições e colocadas em placas de Petri (100x20 mm) esterilizadas. De cada diluição foram realizadas análises em duplicata. Foram adicionados a cada placa 15,0 a 20,0 mL de ágar padrão para contagem, previamente fundido e resfriado à temperatura de 44 a  $46^{\circ}\text{C}$ . As placas foram homogeneizadas com movimentos suaves em forma de oito (cerca de 10 vezes) e deixadas à temperatura ambiente até a completa solidificação do ágar, após a solidificação as placas foram incubadas a  $35-37^{\circ}\text{C}/24-48$  horas. Foram consideradas para contagem, somente as placas da mesma diluição que apresentaram de 25 a 250 colônias. A contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi obtido multiplicando-se a média aritmética das placas com a mesma diluição pelo respectivo fator de diluição e expressando o resultado em

log Unidades Formadoras de Colônias/ g de amostra (log UFC/g) (ANEXO 2). (JAY, 2005; PINHEIRO, et al., 2005; SOARES e MAIA, 1999; SILVA et al., 1997).

#### **4.3.2. Contagem de Bolores e Leveduras**

Para a contagem de bolores e leveduras, que são microrganismos que crescem em aerobiose e em uma temperatura média de 25°C, foram pipetadas alíquotas de 0,1mL de cada uma das quatro diluições e inoculadas em placas de Petri (100x20 mm) esterilizadas, contendo ágar batata, acidificado com ácido tartárico. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, as amostras foram espalhadas em toda a placa, para cada diluição foram utilizadas placas em duplicata. As placas foram incubadas à temperatura de 25°C durante 3-5 dias. Foram consideradas para contagem, somente as placas da mesma diluição que apresentaram de 25 a 250 colônias, a contagem de leveduras e bolores foi obtida multiplicando-se a média aritmética das placas com a mesma diluição pelo respectivo fator de diluição e expressando o resultado em log Unidades Formadoras de Colônias/ g de amostra (log UFC/g) (ANEXO 3) (JAY, 2005; PINHEIRO et al., 2005; SILVA et al., 1997).

#### **4.3.3. Teste de identificação de bolores - microcultivo**

Após o crescimento dos bolores em placas de ágar batata estes foram identificados com base na macro e micromorfologia. Uma alçada do bolor foi retirada e colocada em lâmina com lamínula, a observação de estruturas características auxiliou na identificação. Alguns bolores não puderam ser identificados por esse método. Com esses bolores que não puderam ser identificados foi realizado o teste de microcultivo. Nesse teste, um círculo de 5,0 mm de diâmetro de ágar batata foi retirado e colocado em uma lâmina, o bolor foi semeado no meio e recoberto com uma lamínula. O conjunto foi

incubado à 25°C durante 3-5 dias. Decorrido esse tempo foi montado uma lâmina com azul de algodão e lamínula e observado a micromorfologia fúngica que auxiliou na sua correta identificação (KONEMAN et al., 2005).

#### **4.3.4. Teste Presuntivo para Coliformes**

A prova presuntiva para coliformes consiste em inocular 1,0 mL de cada uma das diluições previamente preparadas para uma série de três tubos, contendo 9,0 mL de caldo lactosado, contendo tubos de Durham invertidos. Os tubos de caldo lactosado foram incubados a 35°C/24-48 horas. Transcorrido este tempo foi observada a produção de gás nos tubos (ANEXO 4)(SILVA et al., 1997).

#### **4.3.5. Teste confirmatório para Coliformes Totais**

Para contagem de coliformes totais (CT), de todos os tubos de caldo lactosado nos quais ocorreram produção de gás, foi transferido uma alçada de cada tubo para tubos de caldo verde brilhante 2% (VB). Os tubos foram incubados a 35°C/24-48 horas e foi observado o crescimento com produção de gás. Foram anotados os números de tubos de VB com gás, esse teste é confirmatório da presença de coliformes totais. O número mais provável (NMP) foi determinado usando tabelas apropriadas. O resultado foi expresso em log NMP de coliformes totais/g de amostra (ANEXO 4) (SILVA et al., 1997, PINHEIRO et al., 2005).

#### **4.3.6. Teste Confirmatório para Coliformes a 45°C**

Coliformes fecais, termotolerantes ou coliformes a 45°C, são microrganismos anaeróbios facultativos, fermentadores de lactose, com produção de ácido e gás dentro de 24 a 48 horas de incubação à temperatura de 45,5°C (FRANCO & LANDGRAF,

2003; JAY, 2005). Nos tubos de caldo verde brilhante 2% que apresentarem crescimento com produção de gás foram realizados os testes confirmatórios para coliformes a 45°C. Foram retiradas alçadas dos tubos de caldo verde brilhante 2% e transferidos para tubos contendo caldo EC com tubos de Durham invertidos, os tubos foram incubados 45,5°C/24-48 horas em banho-maria. O Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45°C foi determinado utilizando uma tabela adequada para às diluições utilizadas e o resultado foi expresso em log NMP de coliformes a 45°C/g de amostra. Cada tubo que apresentou crescimento positivo foi semeado em placas de meio EMB e foi posteriormente incubado a 35°C/24-48 horas. Após o crescimento as cepas identificadas como fermentadoras foram estocadas em meio TSA para posterior identificação e testes de sensibilidade (ANEXO 4) (SILVA et al., 1997, PINHEIRO et al., 2005).

#### **4.3.7. Presença de *Salmonella* spp**

Na pesquisa de *Salmonella* spp. foi pesada 25,0g da amostra e homogeneizada em 225,0 mL de peptona 1% que foi incubada a 35°C/18-20 h. Após decorrido esse período 1,0 mL do meio foi transferido para dois diferentes caldos de enriquecimento seletivo: caldo tetracionato-novobiocina e caldo selenito-cistina, após a transferência as amostras foram incubadas a 35°C/24 horas. Decorrido esse período, cada amostra, foi semeada em placas de Petri com ágar XLD (xilose-lisina-desoxicolato) e em ágar Hektoen, que foram incubadas a 35°C/24 horas. As colônias típicas obtidas nas placas foram estocadas em meio TSA, para posterior identificação e testes de sensibilidade. O resultado foi expresso como presença ou ausência de *Salmonella* spp/25 g do produto (ANEXO 5)(SILVA et al., 1997, PINHEIRO et al., 2005).

#### **4.3.8. Identificação das Cepas Bacterianas**

As cepas bacterianas estocadas em meio TSA foram repicadas para ágar EMB e colocadas em estufa a 35°C/24 horas. Após o crescimento foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: teste do citrato, produção de indol, motilidade, produção de sulfeto de hidrogênio, uréia, fenilalanina, vermelho de metila, Voges-Proskauer e lisina (MURRAY et al., 2000; KONEMAN et al., 2001).

As cepas características do gênero *Salmonella* spp estocadas em TSA foram semeadas em ágar Hektoen e incubadas a 35°C/24 horas, as cepas foram semeadas em meio LIA e TSI. Foram realizadas ainda provas bioquímicas adicionais (uréia, vermelho de metila, Voges-Proskauer, citrato, indol e motilidade). Culturas características do gênero *Salmonella* foram submetidas ao teste de aglutinação com soros anti-somático poli "O" e anti-flagelar poli "H" de *Salmonella* (Probac-Brasil) (ANEXO 5)(SILVA et al., 1997, PINHEIRO et al., 2005).

#### **4.3.9. Testes de Sensibilidade a Antibióticos (TSA)**

A susceptibilidade a um painel de 11 antibióticos (ampicilina, estreptomicina, canamicina, gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprima, sulfonamidas, ácido nalidixico, ciprofloxacina e cefotaxima) é recomendada para enteropatógenos, a cefotaxima é utilizada para rastrear a produção de ESBL (POLITI et al., 2005). Neste trabalho foram identificadas, selecionadas e avaliadas 68 cepas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*: *E. coli* (29), *K. pneumoniae* (24) e *E. aerogenes* (15), foi avaliado o perfil de sensibilidade aos seguintes antimicrobianos: amicacina (10µg), ampicilina (10µg), ciprofloxacina (5µg), ceftazidima (30µg), estreptomicina (10µg), doxiciclina (10µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), sulfonamidas (10µg) e sulfametoxazol +

trimetoprim (25/1,5µg). Substituiu-se a cefotaxima pela ceftazidima para rastrear a produção de ESBL. As cepas foram testadas utilizando-se a metodologia de Kirby-Bauer, método de difusão de discos contendo o antimicrobiano em meio de cultura Muller-Hinton (MURRAY, et al., 2000; CLSI, 2002).

**4.3.10. Avaliação do halo de ceftazidima para triagem de cepas produtoras de ESBL entre as cepas de *E.coli*, *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* isoladas de amostras de Hortaliças.**

Paras as cepas de *E.coli*, *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* foram avaliadas o halo da ceftazidima, pelo método de diluição em ágar. Cepas produtoras de ESBL possuem halo para a ceftazidima  $\leq 22$  mm, os halos foram medidos utilizando um paquímetro (CLSI, 2000; CLSI, 2003) .

## 5.RESULTADOS

### 5.1.Contagens de Microrganismos Aeróbios Mesófilos.

Na Tabela 3 são mostradas as contagens de microrganismos aeróbios mesófilos nas amostras de hortaliças minimamente processadas analisadas. São destacada as médias, os desvio padrão e o intervalo das contagens desses microrganismos.

Tabela 3: Contagens de microrganismos aeróbios mesófilos em hortaliças minimamente processadas.

log UFC/g de amostra			
Amostra <sup>Ψ</sup>	Nº de amostras	Média (DP)	Intervalo
AC	8	8,88 (1,50)	8,87 - 8,88
AF	10	7,69(0,23)	7,37 - 8,08
TC	8	6,90 (0,65)	5,60 - 8,85
RRRV	8	8,68 (1,17)	6,40 - 9,65
CV	10	8,93 (2,07)	6,30 - 10,95
CR	8	8,62 (1,76)	6,02 - 9,96
CRRVRR	10	8,64 (1,56)	6,00 - 9,37
SAL	10	13,03 (0,32)	12,81-13,35
CCSP	8	8,20 (1,61)	6,45 – 9,50

<sup>Ψ</sup>AC – Acelga; AF - alface; TC - tomate cereja; RRRV – repolho roxo, repolho verde; CV – cenoura e vagem; CR – cenoura ralada; CRRVRR – cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo; SAL – saladas; CCSP – coentro, cebola e salsa picados.

## 5.2. Contagem de Bolores e Leveduras

Na Tabela 4 são mostradas as contagens encontradas para bolores e leveduras.

Tabela 4: Contagem de Bolores e Leveduras em hortaliças minimamente processadas.

Amostra <sup>Ψ</sup>	Nº de amostras	log UFC/g de amostra	
		Média (DP)	Intervalo
AC	8	10,11 (0,71)	9,60-10,61
AF	10	6,28 (0,30)	5,54 - 6,46
TC	8	7,56 (0,34)	6,52 - 9,00
RRRV	8	8,87 (0,78)	7,47 - 9,36
CV	10	8,45 (0,92)	7,30 – 9,53
CR	8	8,44 (1,10)	7,30 – 9,82
CRRVRR	10	8,22 (1,27)	7,00 – 9,83
SAL	10	7,71 (0,71)	7,00-8,55
CCSP	8	8,02 (1,31)	7,38 – 9,88

<sup>Ψ</sup> AC – Acelga; AF - alface; TC - tomate cereja; RRRV – repolho roxo, repolho verde; CV – cenoura e vagem; CR – cenoura ralada; CRRVRR – cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo; SAL – saladas; CCSP – coentro, cebola e salsa picados.

## 5.3. Identificação de Bolores em Hortaliças Minimamente Processadas.

Das 29 cepas de bolores isolados de hortaliças minimamente processadas foram identificadas 5 espécies principais como descrito na Figura 2.

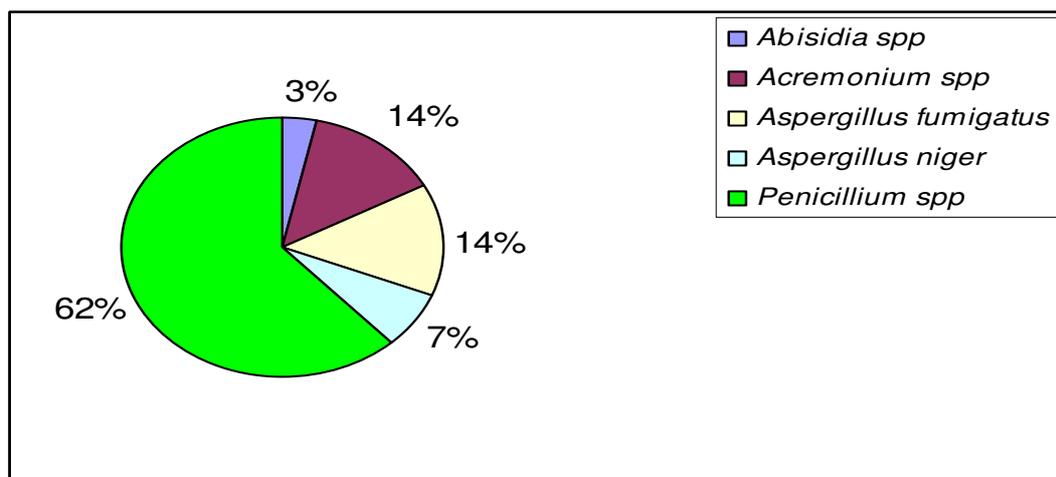


Figura 2: Bolors isolados e identificados em hortaliças minimamente processadas.

#### 5.4. Número Mais Provável de Coliformes Totais, Coliformes a 45°C, *Escherichia coli* e *Salmonella* nas Amostras de Hortaliças.

Nas Tabela 5 a 13 estão descritos os resultados da determinação da qualidade microbiológica das amostras de hortaliças minimamente processada comercializada em Fortaleza.

Tabela 5: Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, *E.coli* e presença de *Salmonella* encontrados em acelga minimamente processada analisadas.

Amostras	Coliformes Totais (log NMP/g)	Coliformes a 45°C (log NMP/g)	<i>E. coli</i> (log NMP/g)	<i>Salmonella</i>
AC1	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
AC2	≥ 4,38	3,38	3,38	Ausência
AC3	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
AC4	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
AC5	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
AC6	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
AC7	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
AC8	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência

AC- Acelga

Todas as amostras de acelga encontram-se impróprias para o consumo pois apresentaram quantidades superiores a 100 coliformes a 45°C/ g de amostra. Em todas as amostras foram detectadas cepas de *E. coli*. Não foram detectadas *Salmonellas*.

Entre as hortaliças mais vendidas para o consumo *in natura* está a alface (*Lactuca sativa*), muito utilizada no consumo doméstico, nas cadeias de *fast foods* e restaurantes comerciais. A alface é a hortaliça mais comercializada no Brasil, devido ao seu baixo valor calórico qualifica-se para várias dietas, constituindo-se em um componente imprescindível das saladas dos brasileiros (FERNANDES et al., 2002).

Muitos fatores influenciam a qualidade de alfaces minimamente processadas incluindo práticas culturais, cultivar e maturação na colheita, métodos de colheita, manuseio do campo até o local de preparação, critério de inspeção, duração e condições de estocagem. Somente um sistema de manuseio integrado e completo permite um excelente controle sobre os fatores de qualidade (PHILLIPS, 1996). A qualidade microbiológica de 10 amostras de alface minimamente processadas é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6: Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, *E.coli* e presença de *Salmonella* encontrados em alface minimamente processada analisadas.

Amostras	Coliformes Totais (log NMP/g)	Coliformes a 45°C (log NMP/g)	<i>E.coli</i> (log NMP/g)	<i>Salmonella</i>
AF1	≥ 4,38	≥ 4,38	< 0,3	Ausência
AF2	≥ 4,38	≥ 4,38	< 0,3	Ausência
AF3	≥ 4,38	2,66	< 0,3	Ausência
AF4	≥ 4,38	< 0,3	< 0,3	Ausência
AF5	≥ 4,38	< 0,3	< 0,3	Ausência
AF6	≥ 4,38	1,45	< 0,3	Ausência
AF7	≥ 4,38	1,38	< 0,3	Ausência
AF8	≥ 4,38	≥ 4,38	< 0,3	Ausência
AF9	≥ 4,38	0,95	< 0,3	Ausência
AF10	≥ 4,38	≥ 4,38	< 0,3	Ausência

AF - Alface

Das amostras de alface estudadas, 50% estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação, pois apresentaram quantidades inferiores a 100 coliformes a 45°C/ g de amostra. Não foram detectadas *E. coli* nem *Salmonella* nas amostras de alface analisadas.

As hortaliças, dentre elas o tomate tipo cereja, situam-se entre as culturas que proporcionam rápido retorno econômico. O grande diferencial do tomate cereja é ser muito saboroso e adocicado, a ponto de ser consumido como fruta. Enquanto o tomate tradicional possui grau Brix entre 4 e 6, as variedades cereja possuem doçura suficiente para chegar entre 9 e 12 graus Brix, que indica a concentração de sólidos solúveis totais, principalmente os açúcares. Isso faz toda a diferença e, pelo mundo, esse tomate passou a ser consumido como uvas, além de também enfeitar e dar um toque de classe nas saladas (CARVALHO et al., 2002). A qualidade microbiológica dos tomates cerejas comercializados na cidade de Fortaleza são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, *E.coli* e presença de *Salmonella* encontrados em tomate cereja minimamente processada analisadas.

Amostras	Coliformes Totais (log NMP/g)	Coliformes a 45°C (log NMP/g)	<i>E. coli</i> (log NMP/g)	<i>Salmonella</i>
TC1	≥ 4,38	< 0,3	< 0,3	Ausência
TC2	1,84	< 0,3	< 0,3	Ausência
TC3	3,08	< 0,3	< 0,3	Ausência
TC4	2,06	< 0,3	< 0,3	Ausência
TC5	2,05	< 0,3	< 0,3	Ausência
TC6	3,02	< 0,3	< 0,3	Ausência
TC7	≥ 4,38	2,38	2,38	Ausência
TC8	≥ 4,38	3,38	3,38	Ausência

TC- Tomate-cereja.

Dos tomates cereja analisados 75% estavam dentro padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira.

O repolho é uma hortaliça anual formada por inúmeras folhas que se imbricam, dando origem a uma “cabeça”, que constitui a parte comestível da planta. As variedades mais adaptáveis ao processamento mínimo são aquelas que apresentam alta compactidade da cabeça, pois oferecem maior resistência ao corte e, conseqüentemente, resultam num corte de melhor qualidade (FANTUZZI et al., 2004). A Tabela 8 mostra as contagens encontradas em repolho minimamente processados.

Tabela 8: Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, *E.coli* e presença de *Salmonella* encontrados em repolho roxo e repolho verde minimamente processada analisadas.

Amostras	Coliformes Totais (log NMP/g)	Coliformes a 45°C (log NMP/g)	<i>E.coli</i> (log NMP/g)	<i>Salmonella</i>
RRRV1	≥ 4,38	<0,3	<0,3	Ausência
RRRV2	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
RRRV3	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
RRRV4	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
RRRV5	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
RRRV6	≥ 4,38	3,38	3,38	Ausência
RRRV7	≥ 4,38	3,38	3,38	Ausência
RRRV8	≥ 4,38	3,38	3,38	Ausência

RRRV- Repolho Roxo, Repolho Verde.

Das amostras de Repolho roxo, repolho verde analisados 87% encontravam-se com contagens de coliformes a 45°C acima do permitido pela legislação.

Das hortaliças minimamente processadas, a cenoura é uma das mais populares, pela sua versatilidade de uso e formas de apresentação ao consumidor, podendo ser ralada em diversos tamanhos ou cortada na forma de fatias, cubos, palitos, e ainda apresentada na forma de mini-cenoura “baby-carrot” (LANA, 2000). Em função do processamento tornam-se suscetíveis a várias mudanças fisiológicas e microbiológicas que depreciam a sua qualidade sensorial e limitam sua vida de prateleira Não só o

metabolismo próprio do tecido vegetal, mas também os microrganismos, são responsáveis pela presença de odores e sabores desagradáveis durante o armazenamento de hortaliças minimamente processadas (RESENDE et al., 2004). Na escolha de hortaliças pré-processadas os consumidores optam por fatores como praticidade, facilidade de preparo, higiene, aparência, sabor e qualidade nutricional. Com seu elevado valor nutricional a cenoura participa como fonte importante de  $\beta$ - caroteno (pró-vitamina A), minerais e possui baixa caloria. A Tabela 9 evidencia a qualidade microbiológica da cenoura e vagem minimamente processada comercializada em Fortaleza.

Tabela 9. Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, *E.coli* e presença de *Salmonella* encontrados em cenoura e vagem minimamente processada analisadas.

Amostras	Coliformes Totais (log NMP/g)	Coliformes a 45°C (log NMP/g)	<i>E. coli</i> (log NMP/g)	<i>Salmonella</i>
CV1	≥4,38	≥4,38	≥4,38	Ausência
CV2	≥4,38	≥4,38	≥4,38	Ausência
CV3	≥4,38	≥4,38	≥4,38	Ausência
CV4	≥4,38	≥4,38	≥4,38	Ausência
CV5	≥4,38	2,30	2,30	Ausência
CV6	≥4,38	≥4,38	≥4,38	Ausência
CV7	≥4,38	≥4,38	≥4,38	Ausência
CV8	≥4,38	≥4,38	≥4,38	Ausência
CV9	≥4,38	≥4,38	3,38	Ausência
CV10	≥4,38	≥4,38	≥4,38	Ausência

CV- Cenoura e Vagem

Todas as amostras analisada encontravam-se acima dos padrões permitidos pela legislação brasileira para coliformes a 45°C. Na cenoura ralada analisada na Tabela 10 é possível observar que as amostras apresentaram elevada carga microbiana.

Tabela 10: Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, *E.coli* e presença de *Salmonella* encontrados em cenoura ralada minimamente processada analisadas.

Amostras	Coliformes Totais (log NMP/g)	Coliformes a 45°C (log NMP/g)	<i>E. coli</i> (log NMP/g)	<i>Salmonella</i>
CR1	≥ 4,38	3,38	3,38	Ausência
CR2	≥ 4,38	3,38	3,38	Ausência
CR3	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CR4	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CR5	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CR6	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CR7	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CR8	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência

CR- Cenoura ralada.

Ao se juntar cenoura ralada, repolho roxo e verde as contagens microbianas se mostraram elevadas como pode ser visto na Tabela 11. Todas as amostras estavam fora dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira.

Tabela 11: Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, *E.coli* e presença de *Salmonella* encontrados em cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo minimamente processada analisadas.

Amostras	Coliformes Totais (log NMP/g)	Coliformes a 45°C (log NMP/g)	<i>E. coli</i> (log NMP/g)	<i>Salmonella</i>
CRRVRR1	≥ 4,38	4,04	4,04	Ausência
CRRVRR2	≥ 4,38	4,04	4,04	Ausência
CRRVRR3	≥ 4,38	3,38	3,38	Ausência
CRRVRR4	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CRRVRR5	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CRRVRR6	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CRRVRR7	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CRRVRR8	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CRRVRR9	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CRRVRR10	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência

CRRVRR-Cenoura ralada, repolho roxo, repolho verde.

Todas as amostras de Cenoura ralada, repolho roxo, repolho verde estavam acima dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira para hortaliças minimamente processadas.

As foram analisadas: 2 amostras de salada primavera (SP1 e SP2) composta de acelga, cenoura e repolho verde; 3 amostras de salada colorida (SC1, SC2 e SC3) composta de repolho, cenoura e alface crespa; 3 amostras de salada spring (SS1, SS2 e SS3) composta de alface crespa, repolho, salsa e cenoura e 2 amostras de salada classic (SCL1 e SCL2) composta de alface crespa, cenoura e tomate cereja. Foram analisadas duas amostras de cada salada. Na tabela 12 pode ser observada a qualidade microbiológica das saladas analisadas.

Tabela 12: Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, *E.coli* e presença de *Salmonella* encontrados em saladas minimamente processada analisadas.

Amostras	Coliformes Totais (log NMP/g)	Coliformes a 45°C (log NMP/g)	<i>E. coli</i> (log NMP/g)	<i>Salmonella</i>
SP1	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
SP2	≥ 4,38	3,66	3,66	Ausência
SC1	≥ 4,38	2,30	2,30	Ausência
SC2	≥ 4,38	2,30	2,30	Ausência
SC3	≥ 4,38	2,30	2,30	Ausência
SS1	≥ 4,38	2,38	2,38	Ausência
SS2	≥ 4,38	1,97	1,97	Ausência
SS3	≥ 4,38	1,30	1,30	Ausência
SCL1	≥ 4,38	3,38	3,38	Ausência
SCL2	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência

SP- Salada Primavera. SC- Salada Colorida. SS- Salada Spring. SCL-Salada Classic

Das amostras de saladas analisadas 80% apresentaram contagens acima do permitido pela legislação brasileira.

O coentro (*Coriandrum sativum* L.) é uma olerícola, consumido em diversas regiões do Brasil, especialmente no Norte e Nordeste. Seu cultivo visa não somente a obtenção de massa verde utilizada na composição de diversos pratos, como o uso para tempero. As sementes são bastante utilizadas na indústria como condimento para carne

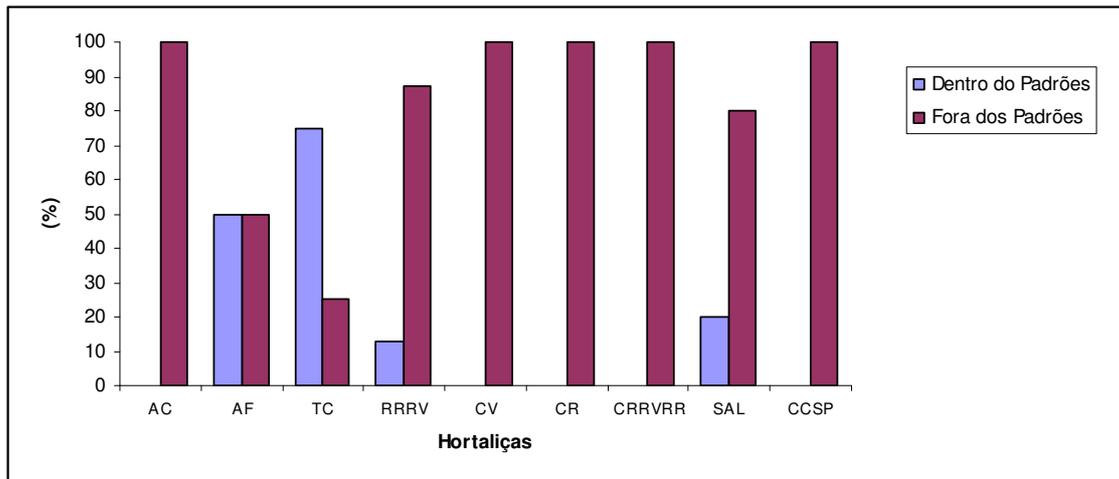
defumada e na fabricação de pães, doces, picles e licores finos (OLIVEIRA et al., 2002)). O coentro e a salsa (*Petroselinum crispum*) picados são muito apreciados pelos cearenses e são costumeiramente consumidos crus. Todas as amostras analisadas encontravam-se impróprias para o consumo (Tabela 13).

Tabela 13: Número mais Provável (NMP/g) de coliformes totais, coliformes a 45°C, *E.coli* e presença de *Salmonella* encontrados em coentro cebola e salsa picadas minimamente processada analisadas.

Amostras	Coliformes Totais (log NMP/g )	Coliformes a 45°C (log NMP/g)	<i>E.coli</i> (log NMP/g)	<i>Salmonella</i>
COP1	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
COP2	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CEP3	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
CEP4	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
SP1	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência
SP2	≥ 4,38	2,97	2,97	Ausência
SP3	≥ 4,38	3,18	3,18	Ausência
SP4	≥ 4,38	≥ 4,38	≥ 4,38	Ausência

COP-Coentro picado. CEP-Cebola Picada. SP-Salsa Picada.

As análises microbiológicas para coliformes a 45°C das hortaliças reprovaram quase a totalidade das amostras (Figura 3).



AC – Acelga; AF - alface; TC - tomate cereja; RRRV – repolho roxo, repolho verde; CV – cenoura e vagem; CR – cenoura ralada; CRRVRR – cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo; SAL – saladas; CCSP – coentro, cebola e salsa picados.

Figura 3: Resultados das análises microbiológicas das amostras de hortaliças minimamente processadas para o parâmetro coliforme a 45°C.

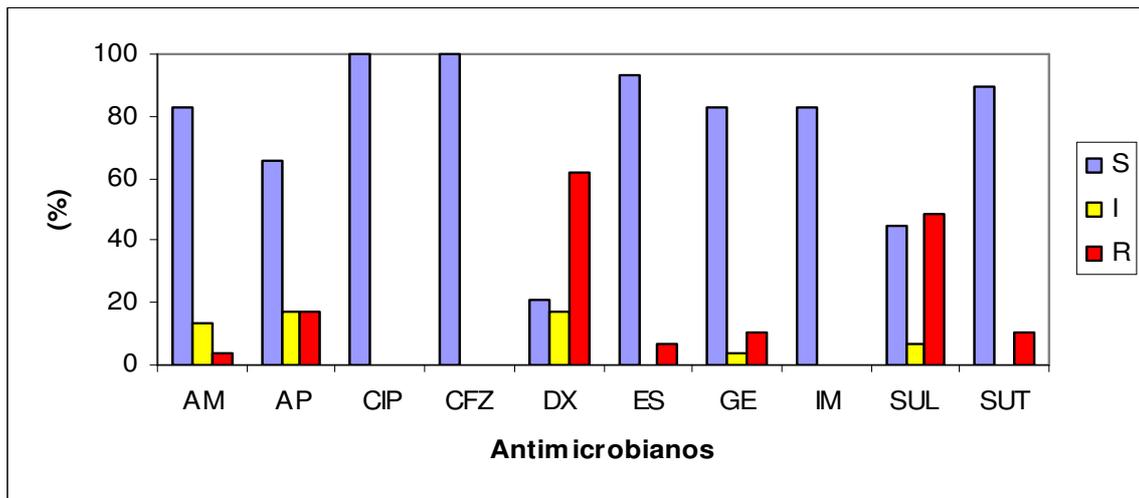
### 5.5. Perfil de sensibilidade a antibióticos das cepas de *E.coli* isoladas de amostras de Hortaliças.

No nosso estudo foram selecionadas 29 cepas de *E. coli* e realizados os testes de sensibilidade a antibióticos. A Tabela 14 e as Figuras 4, 5 e 6 mostra o perfil de sensibilidade de cepas de *E. coli* isoladas de hortaliças minimamente processadas. A Figura 4 mostra o perfil de resistência, sensibilidade e intermediário das cepas de *E. coli* aos dez antimicrobianos testados.

Tabela 14: Perfil de sensibilidade de cepas de *E. coli* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

Bactérias Nº da cepa	Hortaliça de origem	Antimicrobianos testados									
		AM	AP	CIP	CFZ	DX	ES	GE	IM	SUL	SUT
50.227	CP	S	I	S	S	R	S	S	S	R	S
50.236	CP	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R
50.237	CP	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
50.238	CP	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
50.239	CP	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
50.248	CR	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
50.250	CR	I	S	S	S	R	S	S	S	R	S
50.303	CP	I	R	S	S	R	S	R	S	R	R
50.304	CP	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
50.305	CP	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R
50.306	CP	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S
50.308	CR	I	R	S	S	I	S	S	S	R	S
50.310	CR	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S
50.311	CR	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S
50.315	CR	I	R	S	S	I	S	I	S	S	S
50.316	CR	S	I	S	S	I	S	S	S	R	S
50.348	CRRVRR	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S
50.349	CRRVRR	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
50.350	CRRVRR	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
50.351	TC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
50.352	TC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
50.353	TC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
50.354	CR	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
50.364	CRRVRR	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
50.365	CRRVRR	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
50.517	CP	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S
50.518	CP	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
50.521	AC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
50.533	CRRVRR	S	I	S	S	S	R	R	S	I	S
<i>K.</i>		S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>pneumoniae</i>											
ATCC											
13883											

AM – amicacina; AP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; CFZ – ceftazidima; DX – doxiciclina; ES- estreptomicina; GE – gentamicina; IM – imipenem; SUL- sulfonamidas; SUT – sulfametoxazol + trimetoprim. AC – Acelga; TC - tomate cereja; CR – cenoura ralada; CRRVRR – cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo; CP – coentro picado. I-intermediário; R-resistente; S-sensível.



AM – amicacina; AP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; CFZ – ceftazidima; DX – doxiciclina; ES-estreptomicina; GE – gentamicina; IM – imipenem; SUL- sulfonamidas; SUT – sulfametoxazol + trimetoprim. S-Sensibilidade. I-Intermediário. R-Resistente.

Figura 4: Percentual de sensibilidade e resistência a antimicrobianos das cepas de *E. coli* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

Na Figura 5 é possível observar o percentual de cepas de *E. coli* que apresentaram sensibilidade a todas as drogas e resistência a um ou mais antibióticos testados.

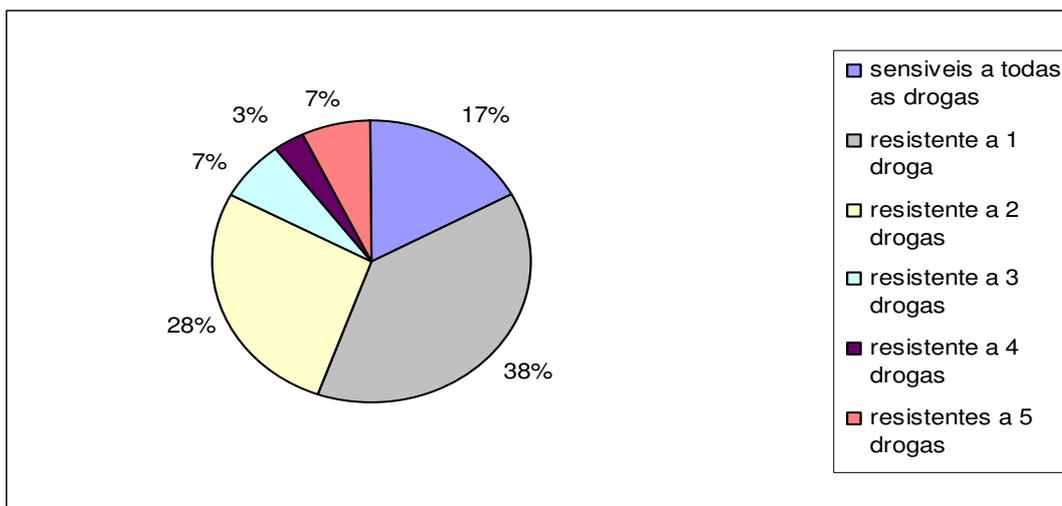
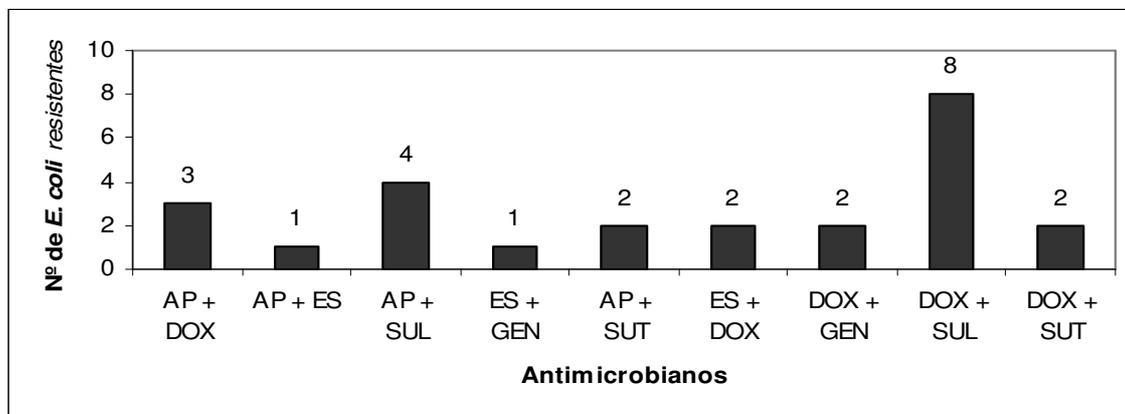


Figura 5: Mono e multiresistência de cepas de *E. coli* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

Na Figura 6 é possível observar os tipos de resistências mais comumente associadas. A mais resistência mais comum observada foi à doxiciclina e sulfonamidas.



AM – amicacina; AP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; CFZ – ceftazidima; DX – doxiciclina; ES- estreptomicina; GE – gentamicina; IM – imipenem; SUL- sulfonamidas; SUT – sulfametoxazol + trimetoprim.

Figura 6: Tipos de associações de resistência a drogas antimicrobianas mais comumente encontradas em cepas de *E. coli* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

### 5.6. Perfil de sensibilidade a antibióticos de cepas de *K. pneumoniae* isoladas de amostras de Hortaliças.

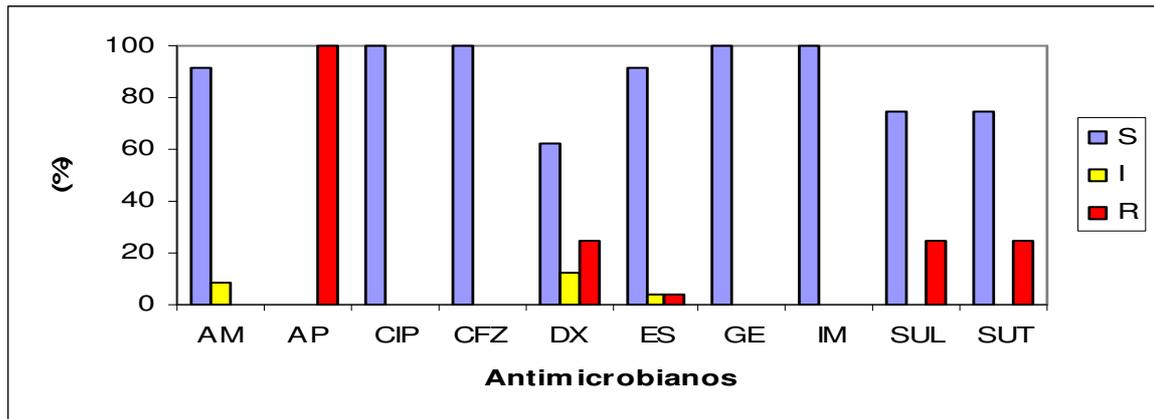
A *K. pneumoniae* é um patógeno oportunista que causa infecções em pacientes imunocomprometidos podendo causar bacteremia, septicemia, infecções urinárias, doenças pulmonares crônicas, infecções dos tecidos moles, diarreia e endoftalmite (PODSCHUM e ULLMANN 1998). A Tabela 15 evidencia o perfil de sensibilidade de cepas de *K. pneumoniae*.

Tabela 15: Perfil de sensibilidade de cepas de *K. pneumoniae* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

Bactérias Nº da cepa	Hortaliça de origem	Antimicrobianos testados									
		AM	AP	CIP	CFZ	DX	ES	GE	IM	SUL	SUT
50.527	AC	S	R	S	S	I	S	S	S	R	R
50.530	CV	S	R	S	S	I	S	S	S	R	R
50.531	CV	I	R	S	S	R	S	S	S	R	S
50.535	CRRVRR	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S
50.536	CRRVRR	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S
50.537	RRRV	S	R	S	S	R	I	S	S	R	R
50.538	RRRV	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
50.539	RRRV	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S
50.540	RRRV	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
50.912	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.918	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
50.919	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.922	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.924	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.925	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
50.926	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.927	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.928	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.929	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.930	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
50.931	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.932	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.933	AF	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
50.934	AF	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883		S	R	S	S	R	S	S	S	S	S

AM – amicacina; AP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; CFZ – ceftazidima; DX – doxiciclina; ES- estreptomicina; GE – gentamicina; IM – imipenem; SUL- sulfonamidas; SUT – sulfametoxazol + trimetoprim. AC – Acelga; RRRV – repolho roxo, repolho verde; CV – cenoura e vagem; CRRVRR – cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo. I-intermediário; R-resistente; S-sensível.

Nas Figuras 7, 8 e 9 podem ser observados os comportamentos da resistência em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de hortaliças minimamente processadas.



AM – amicacina; AP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; CFZ – ceftazidima; DX – doxiciclina; ES- estreptomicina; GE – gentamicina; IM – imipenem; SUL- sulfonamidas; SUT – sulfametoxazol + trimetoprim. S-Sensibilidade. I-Intermediário. R-Resistente.

Figura 7: Percentual de sensibilidade e resistência a antimicrobianos das cepas de *K. pneumoniae* isoladas de hortaliças minimamente processadas

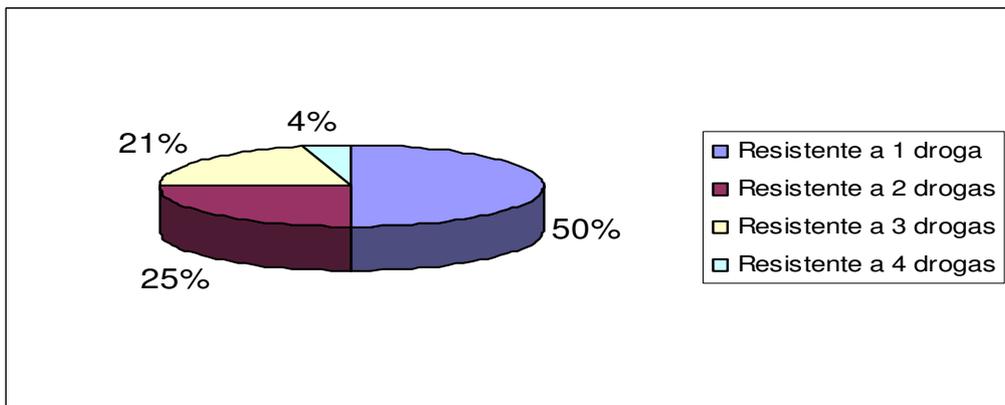
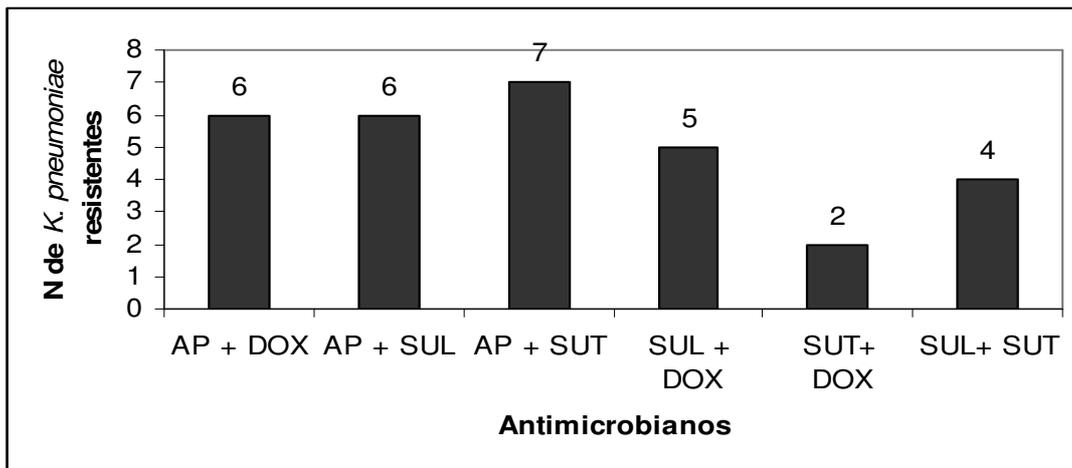


Figura 8: Mono e multiresistência de cepas de *K. pneumoniae* isoladas de hortaliças minimamente processadas.



AM – amicacina; AP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; CFZ – ceftazidima; DX – doxiciclina; ES- estreptomicina; GE – gentamicina; IM – imipenem; SUL- sulfonamidas; SUT – sulfametoxazol + trimetoprim.

Figura 9: Tipos de associações de resistência à drogas antimicrobianas mais comumente encontradas em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

### 5.7. Perfil de sensibilidade a antibióticos das cepas de *E. aerogenes* isoladas de amostras de Hortaliças.

*Enterobacter* spp. tem se tornado patógenos importantes nos últimos anos. Muitos desses organismos são resistentes a antimicrobianos antigos e tem a habilidade de desenvolver rápida resistência a novos agentes (SANDERS e SANDERS, 1997).

O gênero *Enterobacter* pertence a família *Enterobacteriaceae* e pode ser rapidamente diferenciado do gênero *Klebsiella*. *Enterobacter* spp são móveis, urease negativa e ornitina descaboxilase positiva. *Enterobacter* spp são resistentes a cefalotina e cefoxitina enquanto *Klebsiella* spp são susceptíveis a esses agentes (KONEMAN et al., 2000).

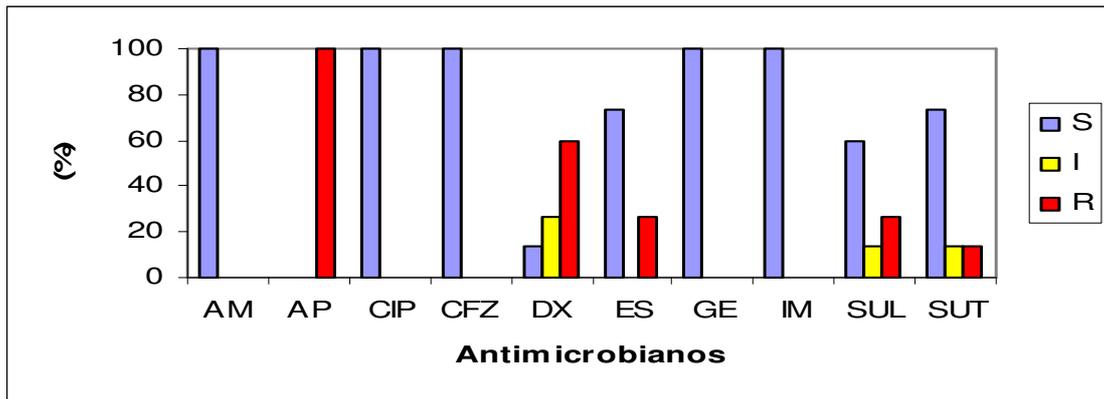
Na Tabela 16 são mostrados o perfil de sensibilidade de cepas de *E. aerogenes*.

Tabela 16: Perfil de sensibilidade de cepas de *E. aerogenes* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

Bactérias Nº da cepa	Hortaliça de origem	Antimicrobianos testados									
		AM	AP	CIP	CFZ	DX	ES	GE	IM	SUL	SUT
50.341	RRRV	S	R	S	S	I	S	S	S	S	I
50.371	CV	S	R	S	S	R	R	S	S	I	S
50.372	CV	S	R	S	S	R	S	S	S	S	I
50.375	RRRV	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
50.376	RRRV	S	R	S	S	I	S	S	S	I	S
50.378	TC	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S
50.379	CV	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S
50.754	SAL1	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
50.756	SAL2	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S
50.758	SAL3	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
50.761	SAL4	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S
50.769	SAL5	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
50.774	SAL6	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R
50.775	SAL7	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R
50.778	SAL8	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S
<i>E.aerogenes</i> ATCC 13048		S	R	S	R	R	S	S	S	R	R

AM – amicacina; AP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; CFZ – ceftazidima; DX – doxiciclina; ES- estreptomicina; GE – gentamicina; IM – imipenem; SUL- sulfonamidas; ST – sulfametoxazol + trimetoprim. SAL – salada; TC - tomate cereja; RRRV – repolho roxo, repolho verde; CV – cenoura e vagem. I-intermediário; R-resistente; S-sensível.

Nas Figuras 10, 11 e 12 são mostrados com se comportou a resistência em cepas de *E. aerogenes*.



AM – amicacina; AP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; CFZ – ceftazidima; DX – doxiciclina; ES- estreptomicina; GE – gentamicina; IM – imipenem; SUL- sulfonamidas; SUT – sulfametoxazol + trimetoprim. S-Sensibilidade. I-Intermediário. R-Resistente.

Figura 10: Percentual de sensibilidade e resistência a antimicrobianos das *E. aerogenes* isoladas de hortaliças minimamente processadas frente aos antibióticos testados.

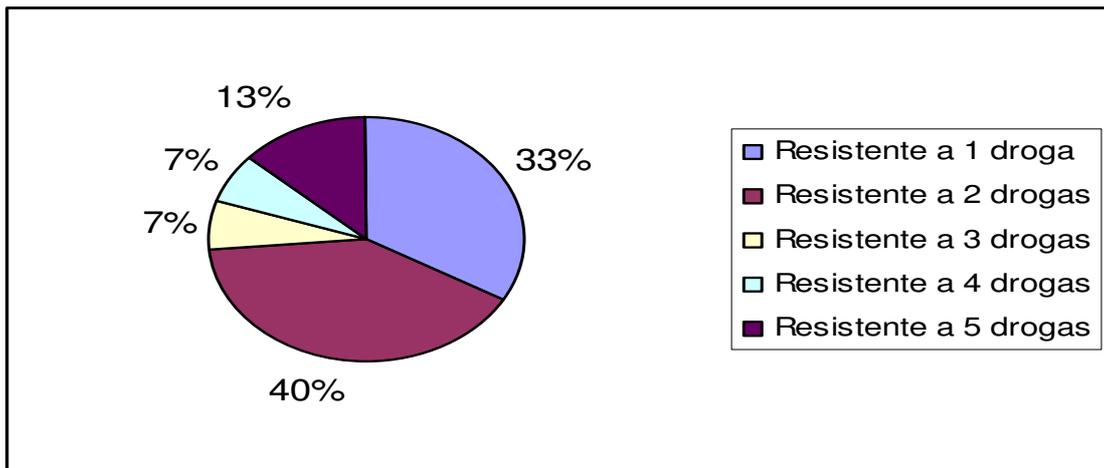
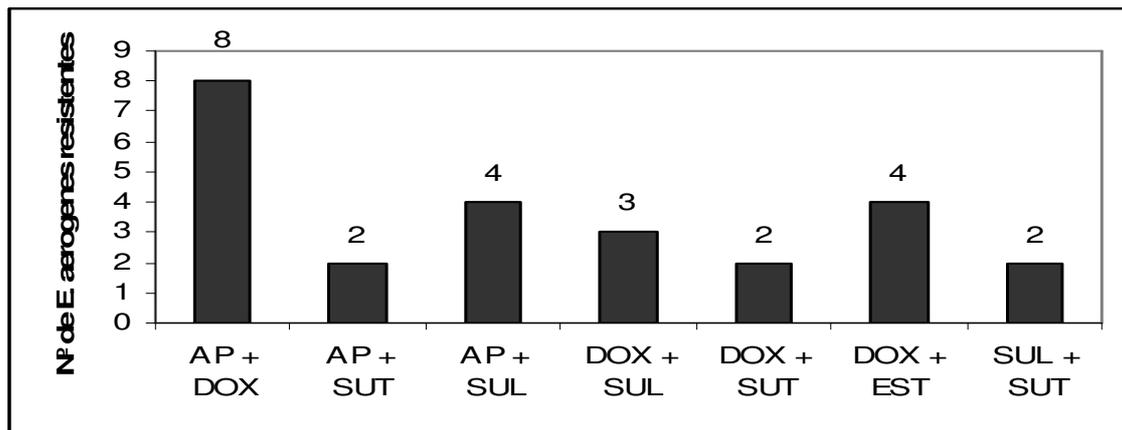


Figura 11: Mono e multiresistência de *E. aerogenes* isoladas de hortaliças minimamente processadas.



AM – amicacina; AP- ampicilina; CIP- ciprofloxacina; CFZ – ceftazidima; DX – doxiciclina; ES- estreptomicina; GE – gentamicina; IM – imipenem; SUL- sulfonamidas; SUT – sulfametoxazol + trimetoprim.

Figura 12: Tipos de associações de resistência à drogas antimicrobianas mais comumente encontradas em cepas de *E. aerogenes* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

### 5.8.Triagem para produção de ESBL por cepas *E.coli*, *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* isoladas de amostras de Hortaliças.

No presente estudo nenhuma cepa isolada apresentou halo  $\leq 22$  mm. Confirmando que essas cepas não são produtoras de ESBL.

## 6.DISCUSSÃO

Hortalças são parte essencial da dieta humana. Pesquisas mostram que uma dieta bem balanceada em frutas e hortaliças promove uma boa saúde e pode reduzir o risco de doenças (BEUCHAT, 1996).

A sociedade moderna é caracterizada por um aumento da consciência em relação à saúde e existe um maior interesse no papel dos alimentos para garantir a saúde. Hortaliças e frutas são reconhecidas como benéficas na manutenção da saúde e na proteção contra o câncer e doenças degenerativas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) sugere o consumo de 400 g diariamente de hortaliças e frutas para a manutenção da saúde (RAGAERT et al., 2004).

Em geral, surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ocorrem devido a uma série de fatores relacionados ao crescimento microbiano, a contaminação ou a sobrevivência do microrganismo no alimento (FORSYTHE, 2002).

Embora bactérias espoliadoras, leveduras e bolores dominem a microbiota de frutas e hortaliças, a ocasional presença de bactérias patogênicas, parasitas e vírus capazes de causar infecções em humanos também têm sido bem documentadas (DeROEVER, 1998).

O aumento do consumo de hortaliças deverá acompanhar o aumento da segurança desses alimentos. Têm sido relatados diversos surtos epidêmicos causados por bactérias ligados ao consumo de hortaliças cruas. No presente estudo foi avaliado a segurança microbiológica de hortaliças minimamente processadas comercializadas na cidade de Fortaleza.

Bactérias aeróbias mesófilas são microrganismos que crescem bem entre 20°C a 45°C e possuem temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 45°C( JAY, 2005). Não

existe no Brasil legislação específica para a quantidade de bactérias aeróbias mesófilas. Na Alemanha e França a contagem dessas bactérias não pode ser superior a 6,99 log UFC/ g em hortaliças minimamente processadas (NGUYEN-THE e CARLIN, 1994). Esse valores encontram diferenças na literatura, SOLBERG et al., 1998 afirmam que contagens acima de 5 log UFC/ g em hortaliças minimamente processadas são indesejáveis. No presente estudo todas as amostras analisadas apresentaram média superior a esse limítrofe (Tabela 3).

Em um estudo conduzido com 159 amostras de hortaliças foi observado que a contagem de bactérias aeróbias mesófilas ficou entre 2,1 a 5,7 log UFC/g de amostra (KANECO et al., 1999). No presente estudo com 80 hortaliças essas contagens variaram de 5,60 a 13,35 log UFC/g de amostra (Tabela 3).

É difícil eliminar todos os patógenos de alface minimamente processadas. A chave para minimizar os riscos associados com a presença de patógenos é: a estrita aderência a boas práticas de manufatura e sanitização, efetivo controle de temperatura durante a estocagem e distribuição e seleção de filmes apropriados para embalagens (SZABO et al., 2000).

Vários trabalhos têm indicado que a contagem de bactérias aeróbias mesófilas em alface minimamente processada está usualmente na faixa de  $10^5$  a  $10^7$  UFC/g de amostra (AHVENAINEM, 1996; BABIC et al., 1996; KANEKO et al., 1999 NGUYEN-THE e CARLIN, 1994). No presente trabalho foi observado um intervalo de log 7,37 a 8,08 log UFC/g de alface (Tabela 3).

Em estudo realizado na cidade de Niterói, Rio de Janeiro com 30 amostras de alface lisa e crespa de diferentes restaurantes foi evidenciado a presença de microrganismos mesófilos em 16/30 (53,3%) das amostras tendo como padrão  $10^7$

UFC/g (PAULA et al., 2003). No presente estudo realizado com 10 amostras de alface todas apresentavam contaminação acima de  $10^7$ .

Foram avaliadas 110 amostras de alfaces, quanto a qualidade microbiológica, amostras de cultivo tradicional e hidropônico, na cidade do Rio de Janeiro. A contagem de aeróbios mesófilos para alface tradicional foi de  $2,1 \times 10^8$  UFC/g, enquanto a hidropônica  $5,0 \times 10^4$  UFC/g (FARIA et al., 2005). Todas as amostras utilizadas no presente estudo foram de cultivo tradicional.

SORIANO e colaboradores, (2004) analisaram 144 amostras de alface de 16 restaurantes universitários da Espanha, observaram que a contagem de aeróbios mesófilos variou de 3,01 a 7,81 log UFC/g de amostra.

SZABO e colaboradores, (2000), observaram em trabalho com 120 amostras de alface uma contaminação de  $10^3$  a  $10^9$  UFC/g de bactérias aeróbias mesófilas.

O mercado para hortaliças minimamente processadas está em expansão, sendo necessário oferecer novos produtos que atendam as necessidades dos consumidores. Uma das estratégias utilizadas é a mistura de hortaliças. Variedades de repolho roxo e verde são misturados produzindo um efeito positivo no consumidor e aumentando a aceitação dos produtos. Em pesquisa realizada com repolho minimamente processado as contagens de mesófilos variaram de 2,75 a 2,58 log UFC/g (IBRAHIM et al., 2005). No presente estudo as contagens de mesófilos em repolho minimamente processado variaram de 6,40 a 9,65 log UFC/g de amostra.

O consumo de saladas de hortaliças frescas e frutas têm aumentado em quantidade e variedade nos países em desenvolvimento. Um grande número de hortaliças minimamente processadas encontra-se disponível em supermercados. Com o

aumento no consumo tem começado a ocorrer o aumento da frequência de surtos de doença associadas com hortaliças e frutas cruas (WEISSINGER et al., 2000).

Em um estudo realizado com 14 tipos de saladas de hortaliças manufaturadas foi observado  $10^5$  UFC/g de amostra para bactérias aeróbias mesófilas (WOJCIK-STOPCZYNSKA, 2004). No presente estudo com 10 tipos diferentes de saladas foram encontrados 12,81 a 13,35 log UFC de bactérias aeróbias mesófilas /g de amostra.

Na literatura estão disponíveis diversas hortaliças, frutas e tubérculos que foram avaliadas quanto a contagens de bactérias aeróbias mesófilas. Em uma pesquisa com quiabo minimamente processado foram encontradas para bactérias aeróbias mesófilas  $6,5 \times 10^4$  UFC /g de amostra (CARNELOSSI et al., 2005). Com espinafre foi observado que a contagem de mesófilos ficou situada em torno de  $10^7$  UFC/g de amostra e elevou-se para  $10^{10}$  após 12 dias de armazenamento (BABIC et al, 1996).

Em amostras de mandioca minimamente processada foram encontradas contagens para mesófilos que variaram de 4 a 9 log UFC/g de amostra durante 6 dias de armazenamento (SILVA et al., 2003).

As contagens de bactérias aeróbias mesófilas encontradas no presente estudo estão mais elevadas do que as contagens encontradas por outros autores, indicando uma falha no processamento dessas hortaliças. No entanto, no Brasil não existe uma legislação específica que estabeleça limites para essa contagem que podem estar presentes em hortaliças. Essas contagens elevadas contribuem para a deterioração da hortaliça diminuindo sua vida de prateleira (BRACKETT 1999).

Bolores e leveduras são capazes de crescer em todos os tipos de alimentos: cereais, carnes, leite, frutas e hortaliças. O crescimento fúngico pode resultar em diversos tipos de espoliação do alimento: produção de toxinas, descoloração, formação

de propágulos patogênicos ou alergênicos. Bolores podem produzir um vasto número de enzimas: lípases, proteases, xilanases e pectinases, dentre outras, além de algumas espécies serem produtoras de micotoxinas (FILTENBORG et al, 1994).

Fungos são contaminantes comuns de hortaliças. Alguns destes fungos são benéficos ao homem, auxiliando na indústria alimentícia, na maturação de queijos, bem como na indústria farmacêutica, na produção de antibióticos (FRANCIS et al., 1999)..

A presença de solo ou material fecal na superfície do produto pode permear o tecido cortado e alterar o meio ambiente ecológico e talvez o comportamento de patógenos da microflora. As hortaliças podem sustentar o crescimento de bolores, leveduras e, conseqüentemente, podem ser deteriorados por esses microrganismos (JAY 2005). O crescimento de bolores nesses ambientes pode resultar em uma elevação do pH, o que aumenta a probabilidade de crescimento de bactérias patogênicas. Colonização e biofilme resultam em condições que podem proteger patógenos contra a morte ou promover o crescimento de microrganismos espoliadores ou patogênicos (BEUCHAT, 2002).

A prevenção da espoliação causada por fungos em alimentos só pode obter sucesso, se as espécies, que estão atualmente espoliando os alimentos forem bastante estudadas e conhecidas, é necessário que estudos sejam realizados na tentativa de identificar e avaliar a importância desses fungos em alimentos (FILTENBORG, 1996).

Existem estudos sobre a contaminação bacteriana de hortaliças e brotos minimamente processados, no entanto, existem poucos trabalhos sobre a contaminação fúngica desses produtos (TOURNAS, 2005).

A contagem de bolores e leveduras variou da ordem de  $10^2$  a  $10^6$  UFC/g de amostra para hortaliças (BRUNO et al., 2005). No presente estudo as contagens de

bolores e leveduras para hortaliças variou de 5,54 a 9,88 log UFC/g de amostra (Tabela 4).

Poucos fungos são capazes de crescer em temperatura de refrigeração e provocar degradação em hortaliças. Entre eles está o *Penicillium* spp (BRACKETT, 1997; SOUZA, et al., 2004). No nosso estudo o principal fungo isolado foi o *Penicillium* spp (Figura 2).

Em um estudo realizado na cidade de Fortaleza com alface, a contagem de bolores e leveduras variou da ordem de  $10^2$  a  $10^6$  UFC/g de amostra (BRUNO et al., 2005). Em nosso estudo foi encontrado resultado semelhante, as contagens de bolores, na alface variaram de 5,54 a 6,59 log UFC/g de amostra (Tabela 4).

Na contagem de bolores e leveduras em alfaces cultivadas pelo modo tradicional e pelo modo hidropônico foram detectados  $4,4 \times 10^5$  UFC/g para tradicional e 100 UFC/g para hidropônica (FARIA et al., 2005).

Em uma pesquisa com quiabo minimamente processado foram encontradas para bolores e leveduras  $1,9 \times 10^3$  UFC/g de amostra (CARNELOSSI et al., 2005).

As leveduras geralmente isoladas de hortaliças minimamente processadas incluem *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Candida* (BRACKETT, 1994).

Em um estudo conduzido com 14 tipos de saladas foram verificados  $10^3$  UFC/g de amostra para leveduras e  $10^2$  UFC/g de amostra para bolores. O principal bolor identificado foi o *Penicillium* spp (WOJCIK-STOPCZYNSKA, 2004). No nosso estudo com saladas foram verificadas contagens 7,00 a 8,55 log UFC/g de amostra.

TOURNAS (2005), estudando saladas de hortaliças isolou e identificou os seguintes bolores: *Alternaria* sp (100-  $5,0 \times 10^3$  UFC/g de amostra), *Cladosporium* sp (100-  $5,9 \times 10^3$  UFC/g de amostra) e *Penicillium* sp (100-  $2,0 \times 10^3$  UFC/g de amostra).

A alta incidência de *Alternaria* sp e *Cladosporium* sp em hortaliças frescas pode ser particularmente devido ao fato desses organismos serem capazes de crescer em baixas temperaturas usadas durante o transporte e comercialização.

Em um estudo realizado com saladas para hot dog a contagem de fungos encontrada foi de  $4,0 \times 10^4$  UFC/g de amostra. Os principais fungos encontrados foram: *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp e *Fusarium* sp (ACEVEDO et al., 2001).

Os fungos, particularmente leveduras, também fazem parte da microbiota natural de frutas e tem sido detectada com frequência em hortaliças minimamente processadas. Não são patogênicas, mas muitas espécies, se presente em grande número, podem provocar alterações nos produtos embalados, como a fermentação, que altera as propriedades sensoriais do alimento (NASCIMENTO et al., 2003).

Dentre os fungos podem ocorrer espécies produtoras de micotoxinas, que são substâncias tóxicas para homens e animais (TOURNAS et al., 2006b). Inúmeras toxinas diferentes são produzidas por fungos do gênero *Penicillium* spp, dentre elas temos: rubratoxina, patulina, citrinina, luteosquirina, cicloclorotina, islanditoxina, rugulosina, ácido micofenólico, decumbina dentre outras (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

Além do *Penicillium* spp outras espécies de bolores identificados estão descritos na Figura 2. Foram isolados *Aspergillus niger*, um bolor muito comum no estado do Ceará, além do *Aspergillus fumigatus*, *Absidia* spp e *Acremonium* spp que são fungos presentes em materiais vegetais e dispersos no ar, desempenhando importante papel na etiologia de alergias respiratórias e intoxicações por micotoxinas, como a aflatoxina produzida por algumas cepas do gênero *Aspergillus* (TOURNAS et al., 2006b).

As espécies de bolores mais comumente isoladas de hortaliças minimamente processadas pertencem aos gêneros: *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Phoma*, *Rhizopus* e *Penicillium* (FRANCIS et al., 1999).

Em um estudo realizado com frutas e saladas de frutas os principais fungos encontrados foram *Penicillium* spp e *Fusarium* spp (TOURNAS et al., 2006a).

No Brasil não existe legislação específica para bolores em hortaliças e existem poucos relatos científicos de isolamento e identificação desses microrganismos.

A resolução RDC n°12, de 2 de janeiro de 2001 do Ministério da Saúde estabelece um limite de tolerância para hortaliças minimamente processadas, para coliformes a 45°C de até 100 UFC/ g do produto e ausência de *Salmonella* sp em 25 g do produto (BRASIL, 2001). Em relação aos coliformes a 45° C temos no nosso estudo que a vasta maioria das hortaliças avaliadas estavam em desacordo com a legislação vigente (Tabelas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13).

A sanitização de hortaliças, sob o ponto de vista da segurança alimentar, é considerada etapa crítica do processamento, assim como os aspectos de higiene pessoal na manipulação do produto (SANT'ANA et al., 2002).

Em um estudo com 3.200 amostras de hortaliças, 48(1,5%) estavam com 100 UFC/g de amostra de *E.coli*, *Salmonella* não foram detectadas. Cerca de 99,5% dos hortaliças apresentavam condições apropriadas de consumo (SAIGOO et al., 2001). No nosso trabalho das 80 amostras analisadas 14 (17,5%) apresentaram número mais provável de coliformes a 45°C menor que 100/g de hortaliça e 66 (82,5%) das amostras apresentaram número mais provável de coliformes a 45°C superiores a 100/ g de hortaliças. Nas amostras analisadas não foram detectadas *Salmonella* spp.

Em um estudo conduzido com beterrabas minimamente processadas, a contagem de coliformes totais foi em média 1,8 NMP/g de produto no primeiro dia de armazenamento. No décimo dia de armazenamento o valor encontrado foi de 46 NMP/g de produto. Em nenhuma das amostras foram detectadas *Salmonella* e os coliformes fecais situaram-se abaixo de 0,3 NMP/g de produto. Como podemos concluir as beterrabas estudadas estavam dentro dos padrões exigidos (VITTI et al., 2004).

Em um estudo realizado com 30 amostras de hortaliças, tubérculos e frutas minimamente processadas adquiridas em supermercados de Fortaleza, foram observados os seguintes resultados: em relação à contagem de coliformes totais 53,3% das amostras de hortaliças e tubérculos analisadas e 33% das amostras de frutas apresentaram resultados superiores a  $10^3$  NMP/g de amostra. Verificou-se que 13,3% das amostras de hortaliças e tubérculos apresentaram contagem de coliformes fecais acima dos exigidos pela RDC nº12 de 2001. Dessas 66,6% foram positivas para a presença de *Salmonella* sp (BRUNO et al., 2005).

Em uma pesquisa com alface lisa em 16/30 amostras (53,3%) foram detectadas a presença de coliformes fecais acima do padrão para hortaliças (100 NMP/g). Não ocorreu detecção de *Salmonella* sp (PAULA et al., 2003).

Embora não existam, na legislação brasileira vigente, padrões para bactérias do grupo coliformes totais, no que diz respeito à quantidade de microrganismo presentes em um alimento, pode-se afirmar que quantidades elevadas ( $>10^5$  UFC/g) são completamente indesejadas, em razão de o alimento perder em qualidades organolépticas, comprometimento da aparência do alimento e presença de microrganismos patogênicos ou deteriorantes. No presente estudo ocorreu uma elevada contagem de coliformes totais o que pode contribuir para a deterioração das hortaliças,

além de apresentar uma carga microbiana que se ingerida pode comprometer a saúde do consumidor.

Quando são adotadas as práticas de manejo correto para hortaliças minimamente processadas pode ocorrer baixa contaminação de microrganismos. No estudo conduzido por PILON, (2003), com hortaliças, os resultados das análises microbiológicas da cenoura e salada mistas minimamente processadas foram negativos para a presença de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais e aeróbios mesófilos.

Em 105 análises de 21 hortaliças (folhas de chicória, saladas mistas, alface crespa), *E. coli* foi isolada de 42,9% das amostras, mas não excedeu os limites estabelecidos pela legislação. *Salmonellas* não foram detectadas. Foi observado nesse estudo que o tempo de armazenamento e a temperatura de estocagem aumentam a quantidade de bactérias heterotróficas (LEGNANI e LEONI, 2004). No presente estudo *E. coli* foi isolada de diversas hortaliças com exceção apenas da alface (Tabela 6).

Em um estudo conduzido com 60 amostras de alface, variedade crespa de sistemas de cultivo diferentes ( tradicional, hidropônico e orgânico) foram analisadas microbiologicamente. Nas amostras orgânicas 56,67% apresentavam coliformes a 45°C acima do permitido; nas alfaces produzidas pelo método tradicional 13,33% estavam com coliformes a 45°C acima do previsto, nas alfaces hidropônicas não foram encontradas coliformes a 45°C. Não foram detectadas *Salmonella* nas amostras (SANTANA et al., 2006).

A manutenção da segurança microbiológica de frutas e hortaliças requer um sistema que acompanhe todos os aspectos da produção, processamento, distribuição e

uso (BRACKETT, 1999). Várias pesquisas sobre hortaliças e frutas são focalizadas em qualidade microbiológica, segurança e processamento (FRANCIS et al., 1999).

Muitos dos fatores que contribuem para a epidemiologia das doenças associadas com frutas e hortaliças são diretamente ou indiretamente influenciados por condições ecológicas que afetam a sobrevivência e o crescimento de microrganismos patogênicos. Adaptação ao estresse ambiental pode resultar em patógeno melhor adaptado e capaz de sobreviver e crescer ou tornar-se mais virulento (ALTEKRUSE e SWERDLOW, 1996).

Em um estudo com salsa (*P. crispum*) e coentro (*C. sativum*) adquirido em supermercados de Fortaleza, foram avaliadas a presença de coliformes a 35°C, coliformes a 45°C, estafilococos, bolores e leveduras. Nas amostras de salsa foi observada a contagem de coliformes a 35°C foi  $\geq 2400$  NMP/g de amostra. Coliformes a 45°C 150 NMP/g de amostra. Bolores e leveduras  $3,0 \times 10^5$  UFC/g. Nas amostras de coentro temos: a contagem de coliformes a 35°C foi  $\geq 2400$  NMP/g de amostra, 460 NMP/g de coliformes a 45°C e  $2,8 \times 10^4$  UFC/g de amostra para bolores e leveduras. As amostras apresentaram elevada carga microbiana (BRUNO e PINTO, 2004). Em nosso estudo com coentro cortado e salsa picado foram observados coliformes a 35°C :  $\geq 4,38$  log NMP/g de amostra, e 2,97 a 4,38 log NMP/g de coliformes a 45°C, estando todas as amostras impróprias para consumo (Tabela 13).

Bactérias Gram-negativas e um pequeno número de leveduras fazem parte da microbiota normal da alface (KING et al., 2005). Bactérias Gram-negativas dominam a microflora associada com muitas hortaliças, enquanto, bolores e leveduras às vezes compreendem a maioria da microflora das frutas, devido a acidez dos tecidos das frutas que geralmente é menor que 4 (ROSA 2002; BEUCHAT, 2002).

Em nosso estudo com hortaliças, 55(81,2%) apresentaram *E. coli*, foram ainda isolados e identificadas *K. pneumoniae* e *E. aerogenes*. Em um estudo realizado com frutas e hortaliças os principais microrganismos isolados foram: *Enterobacter* sp( 55,6%), *S. aureus* (56,9%), *P. aeruginosa* (55,6%). Nas frutas foram isoladas 37,5% de *Salmonella*(VISWANATHAN e KAUR, 2001). Nesse mesmos estudo foi realizado o perfil de sensibilidade de 293 isolados. A maioria dos isolados foram resistentes a ampicilina. A *E. coli* mostrou elevada resistência a carbenicilina (62,8%). Nesse estudo foram isoladas duas cepas de *E. coli* resistentes a cefotaxima. O isolamento de enterobactérias tem um significado em saúde públicas pois esses alimentos geralmente são ingeridos crus (VISWANATHAN e KAUR, 2001).

NASCIMENTO e colaboradores, (2002), estudaram 41 amostras de alface coletadas em feiras livres na cidade de São Luís no Maranhão. Foram isoladas 28 cepas de *E. coli*, 4 *C. freundii*, 3 *S. marcescens*, 3 *K. pneumoniae* e 3 *E. aerogenes*. As cepas que apresentaram maior resistência foram as de *K. pneumoniae*, o autor sugere que essas cepas seriam produtoras de ESBL.

Os microrganismos presentes em hortaliças minimamente processadas variam de  $10^5$  a  $10^7$  UFC/g e 80 a 90% das bactérias são bacilos Gram-negativos predominantemente *Enterobacter* spp, *Pseudomonas* spp, e *Erwinia* spp (JAY 2005).

Microrganismo capaz de causar doenças em seres humanos e outros patógenos em que o potencial para causar doenças é incerto como a *A. hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella* spp, tem sido isolados de alface e amostras de saladas (FRANCIS et al., 1999).

Um estudo demonstrou a capacidade de crescimento de *E.coli* enteropatogênica em hortaliças minimamente processadas que tinha sido estocadas a 9 e 16 °C (BHARATHI et al., 20001).

BOEHME et al., 2004, estudando 20 amostras de hortaliças isolou 92 amostras de enterobactérias. Os gêneros mais comuns foram: *Enterobacter* spp (19 *E. cloacae*); 22 *Citrobacter* spp (8 *C. freundii*) e 21 *Klebsiella* spp (9 *K. pneumoniae*). As hortaliças estudadas foram tomates, cogumelos, saladas e brotos.

Em um estudo com enterobactérias isoladas de saladas para hot dog foram identificadas: *C. freundii*, *E. aerogenes* (ACEVEDO et al., 2001).

Enterobactérias também estão presentes em hortaliças minimamente processadas (BENNICK et al., 1998). Foi possível detectar *E. coli* O157:H7 em alface contaminadas com adubo e armazenadas a 4°C durante 15 dias quando o inóculo foi de apenas 1 a 10 UFC/g de amostra (BEUCHAT, 2002).

As principais bactérias patogênicas isoladas de frutas e hortaliças são: *A. hydrophila*, *E. coli*, *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Pleisomonas shigelloides*, *V. cholera*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *L. monocytogenes* (BRACKETT, 1999).

Bactérias resistentes isoladas de alimentos tem sido visto como fonte potencial de patógenos humanos resistentes (SCHWARTZ et al., 2001). *E. coli* é a principal bactéria do intestino é uma bactéria patogênica e é o principal patógeno em infecções da corrente sanguínea (ERB et al., 2007).

O fenômeno da resistência a antimicrobianos inclui uma variedade de microrganismos e uma variedade de drogas, sendo um fenômeno global. As conseqüências, para saúde pública, do fenômeno da resistência são gigantescos, por que

restringem as opções terapêuticas, além disso grandes companhias farmacêuticas têm restringido os investimentos na descoberta de novos fármacos (BRADFORD 2001).

Em um estudo realizado no estado do Ceará com 124 cepas de *E.coli*, isoladas de alimentos de origem animal, 63% apresentaram resistência a pelo menos dois antibióticos, a sulfonamida foi a droga que apresentou menor ação sobre as cepas (MARTINS, et al., 2005). No nosso estudo das 29 cepas testadas 44,8% apresentaram resistência à sulfonamidas. Na Tabela 14 e nas Figuras 4, 5 e 6 é possível observar como se comportou a resistência entre cepas de *E.coli* isoladas de hortaliças minimamente processadas.

Em um estudo com 406 cepas de *E.coli* isoladas de fezes foi observado resistência de 16,7% à ampicilina, 0,7% à ciprofloxacina e 8,6% ao sulfametoxazol e trimetoprim (STURMER, 2004). No nosso trabalho 17,24% das cepas de *E. coli* foram resistentes à ampicilina e 10,3% resistentes a sulfametoxazol + trimetoprim. Não foi observado resistência à ciprofloxacina dentre as cepas de *E. coli* testadas.

Em presente estudo 83% das cepas de *E.coli* estudadas apresentaram resistência a pelo menos uma das drogas testadas. Das cepas estudadas 7% apresentaram resistência a cinco das dez drogas testadas, podendo representar um sério risco a saúde da população (Figura 6).

Na revisão conduzida por ERB et al, 2007, foram avaliadas à resistência à ampicilina, ciprofloxacina e ao sulfametoxazol + trimetoprim, a resistência às cefalosporinas não foi avaliada. Em presente estudo a resistência a ceftazidima não foi encontrada entre as cepas de *E. coli* testadas (Tabela 14).

A incidência de infecções por cepas de *E.coli* produtoras de ESBL é da ordem de 5,5 casos por 100.000 habitantes por ano, 71% desses pacientes começam com uma

infecção comunitária. Pacientes do sexo feminino e com mais de 65 anos estão mais propensos a desenvolver esse tipo de infecção (ERB et al, 2007).

Resistência a antibióticos por parte de cepas de *E. coli* têm sido reportado em todo mundo. No presente estudo as cepas apresentaram resistência à ampicilina e total sensibilidade à ceftazidima.

Em países em desenvolvimento o principal meio de disseminação da resistência a antimicrobianos ocorre através dos alimentos (YATES e AMYES, 2005).

Foram avaliados 11 tipos de amostras de alface: 5 orgânicas e 6 não orgânicas. Foram isoladas 33 cepas de bactérias: *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhanella aquatilis*. Mais de 70% das cepas foram resistentes à ampicilina e a cefalosporinas de 1ª e 2ª geração, um terço foi resistente a cefotaxima. A produção de betalactamases foi demonstrada em cepas de *Pseudomonas* spp. Os autores concluem que os hortaliças cruas são uma fonte potencial de infecções hospitalares em pacientes imunodeprimidos e que bactérias epifíticas apresentam multiresistência (HAMILTON-MILLER, 2001). No nosso estudo não foram detectadas nenhuma cepa de *E. coli* produtora de ESBL, os halos para ceftazidima encontrados foram maiores que 22 mm.

BRIÑAS e colaboradores, 2002, avaliaram a MIC de 124 cepas de *E. coli* isoladas de alimentos e animais e observaram que 97,3% dos isolados apresentaram MIC  $\leq$  0,5 µg/mL para ceftazidima, e nenhuma ESBL foi detectada. Em nosso estudo todas as cepas foram sensíveis a ceftazidima com halos superiores a 22 mm e nenhuma cepa de enterobactérias foram suspeitas da produção e ESBL.

Foram isoladas 132 cepas de *K. pneumoniae* de fontes alimentares, todos os isolados foram resistentes à ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, gentamicina e canamicina. A produção de betalactamases nas cepas isoladas foi o responsável pala

resistência aos antibióticos betalactâmicos. Cerca de 96% dos isolados possuíam o gene *blaSHV-1* e cinco cepas foram capazes de expressar SHV-11 e TEM-1. A transferência desses genes de resistência para cepas de *E. coli* foi demonstrado por transconjugação. Técnicas de biologia molecular mostraram que as cepas originaram-se de uma disseminação clonal, indicando a possível disseminação de genes de resistência no ecossistema e a contaminação cruzada durante o processamento e distribuição dos produtos (KIM et al., 2005). Em nosso estudo todas as cepas de *K. pneumoniae* foram resistentes à ampicilina, as outras resistências importantes observadas foram a sulfonamida e ao sulfametoxazol + trimetoprim. Entre as cepas de *K. pneumoniae* não foram observadas resistência à ciprofloxacina, ceftazidima e imipenem (Tabela 15)(Figura 7, 8 e 9).

Do gênero *Enterobacter* spp. as espécies mais comumente encontradas são: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans* e *E. sakazakii*. Infecções por *E. aerogenes* podem ser adquiridas de fontes endógenas e exógenas, pois essa bactéria é ubíqua. Várias espécies têm sido encontradas em fezes humanas de animais, água, alimentos e insetos (SANDERS e SANDERS, 1997). Todas as amostras de *E. aerogenes* analisados nesse estudo foram resistentes a ampicilina, outras resistências importantes observada foram à doxicilina, estreptomicina e sulfonamidas. Foram isoladas cepas de *E. aerogenes* resistentes a 5 das 10 drogas testadas, representando um sério problema de saúde pública (Tabela 16) (Figura 10,11 e 12). A resistência mais comumente observada foi a ampicilina e a doxiciclina com 8 isolados sendo resistentes (Figura 12). Dentre as cepas de *E. aerogenes* não foram isoladas cepas produtoras de ESBL.

Apesar das elevadas contagens para aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, coliformes totais e coliformes a 45°C, não foram detectadas cepas produtoras de ESBL,

no entanto, foram identificadas cepas multiresistentes a antimicrobianos usados rotineiramente em medicina. As hortaliças podem contribuir para a disseminação da resistência a antimicrobianos. A indústria de alimentos necessita de alternativas tecnológicas para melhorar a qualidade das hortaliças minimamente processadas comercializadas na cidade de Fortaleza. A estrita adesão a Boas Práticas de Fabricação, e a implantação de um programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle pode melhorar a qualidade microbiológica das hortaliças.

## 7.CONCLUSÕES

- As contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, bolores e leveduras, coliformes totais e coliformes a 45°C foram bastante elevadas.
- O principal bolor isolado e identificado foi o *Penicillium* spp.
- Todas as amostras de acelga, cenoura e vagem, cenoura ralada, cenoura ralada, repolho verde e repolho roxo e coentro picados e salsa picadas encontravam-se impróprias para o consumo, pois apresentaram quantidades superiores a 100 coliformes a 45°C/ g de amostra.
- Das amostras de alface 50% apresentavam contagem de coliformes a 45°C acima do permitido peça legislação.
- Dos tomates cereja analisados 75% estavam dentro padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira, para coliforme a 45°C.
- Das amostras de repolho roxo, repolho verde 87% estavam com contagem de coliformes acima do permitido.
- Das amostras de salada 80% estavam fora dos padrões.
- Não foram detectadas *Salmonellas* nas amostras de hortaliças minimamente processadas analisadas.
- As principais enterobactérias isoladas foram *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. aerogenes*.
- Todas as cepas de *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* foram resistentes à ampicilina.

- Foram detectadas cepas de *E. coli*, *K pneumoniae* e *E aerogenes* com multiresistência aos antibióticos testados.
- Não foi observada resistência a ciprofloxacina, ceftazidima e ao imipenem.
- Não foram detectadas cepas de enterobactérias produtoras de ESBL.
- São necessárias alternativas tecnológicas que garantam a segurança microbiológica das hortaliças minimamente processadas comercializadas em Fortaleza. As condições higiênico-sanitárias desses produtos podem ser melhoradas com a aplicação de Boas Práticas em toda a cadeia produtiva e monitoramento do processo de higienização e sanitização.

## 8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, E. MENDOZA, C. OYON, R. Total and coliforms, some enterobacteria, *Staphylococcus* sp and moulds in salads for hot dogs sold in Maracay, Venezuela. **Archivos Latinoamericanos Nutricion**, 51(4):366-70.2001.

ANTONIOLLI, L.R.; BENEDETTI, B.C.; SOUZA FILHO, M.S.M.; BORGES, M.F. Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota do abacaxi pérola minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura de Jaboticabal**, 27(1):157-60.2005.

AHVENAINEM, R. New approaches in improving the shelf life of minimally processed fruit and vegetables. **Trends in Food Science e Technology**,7:179-87.1996.

ALTERKRUSE, S.F.; SWERDLOW, D.L. The changing epidemiology of foodborne disease. **The American Journal Medical Science**, 311.23-9.1996.

BABIC, I.; ROY, S.; WATADA, A.B.; WERGIN, W.P. Changes in microbial populations on fresh cut spinach. **International Journal Food Microbiology**, 31(1-3):107-19.1996.

BENNICK, M.I.; VORSTMAN, H.J.W.; SMID, E.J.; GRORRIS, L.E.M.; The influence of oxygen and carbon dioxide on the growth of prevalent *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* species isolated from fresh and modified atmosphere stored vegetables. **Food Microbiology**, 5:459-69.1998.

BEUCHAT, L.T. Pathogenic microorganisms associated to fresh produce. **Journal Food Protection**, 59:204-16.1996.

BEUCHAT, L.T. Survival of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces applied to lettuce and the effectiveness of chlorinated water as a disinfectant. **Journal Food Protection**, 62:845-9.1999.

BEUCHAT, L.T. Ecologic factor influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. **Microbes Infection**, 4:413-23.2002.

BHARATHI, S.; RAMESH, M.N.; VARADARAJ, M.C. Predicting the behavioural pattern of *Escherichia coli* in minimally processed vegetables. **Food Control**, 12:275-84.2001.

BLASER M.J. How safe is our food? **New England J. Med**, 334: 1324-1326.1996.

BOEHME, S.; WERNER, G.; KLARE, I.; REISSEBROOT, R.; WITTE, W. Occurrence of antibiotic-resistant enterobacteria in agricultural foodstuffs. **Molecular Nutrition Food Research**, 48(7):522-31.2004.

BONNAS, D.S.; CHITARRA, A.B.; PRADO, M.E.T.; TEIXEIRA JUNIOR, D. Qualidade do abacaxi cv. Smooth caynne minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura de Jaboticabal**, 25(2):206-9.2003.

BRACKETT, R.E. Microbiological spoilage and pathogens in minimally processed refrigerated fruits and vegetables, In: \_ **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. New York Chapman & Hall, 269-312.1994.

BRACKETT, R.E. Incidence, contributing factors and control of bacterial pathogens from in produce. **Postharvest Biology Tech**, 15:305-11.1999.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21 st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiologyc Reviews**, 14(4):933-51. 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução **RDC N 12 de 02 de janeiro de 2001**. Brasília. ANVISA.2001.

BRIÑAS, L.; ZARAZAGA, M.; SÁENZ, Y.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C.  $\beta$ -Lactamases in ampicillin-resitant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. **Antimicrobial Agents Chemotheraphy**, 46(10):3156-3163.2001.

BRUNO, L.M.; PINTO, G.A.S. Aplicação de cloro no preparo de hortaliças frescas para consumo doméstico. **Rev. Ciência Agronômica**, 35:259-63.2004.

BRUNO, L.M.; QUEIROZ, A.A.M.; ANDRADE, A.P.C.; VASCONCELOS, N.M.; BORGES, M.F. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente

processadas comercializadas em Fortaleza-Ce. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 23(1):75-84.2005.

CANTWELL M. Postharvest handling systems: minimally processed fruits and vegetables. University of California. 1992.

CARNELOSSI, M.A.G.; YAGUIU, P.; RENOSO, A.C.L; ALMEIDA, G.R.O.; LIRA, M.L.; SILVA, G.R.; JALALI, V.R.R. Determinação das etapas do processamento de quiabo. **Horticultura Brasileira**, 23(4): 970-5. 2005.

CARVALHO, C.R.L.; AZEVEDO FILHO, J.A. MELO, A.M.T. Avaliação de atributos de qualidade de tomates silvestres do tipo cereja pela técnica de PCA. **Horticultura Brasileira**, 20(2): 395. 2002.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Incidence of foodborne illnesses. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 47):782-86. 1998.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically – fifth edition: approved standard CLSI document M7-A5. Wayne, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI).. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 12<sup>th</sup> informational Supplement Document 21(1), 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Thirteenth informational supplement. MIC testing supplemental tables.2003.

DeROEVER, C. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. **Food Control**, 9:321-47.1998.

ERB, A.; STÜRMER, T.; MARRE, R.; BRENNER, H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis**, 26:83-90.2007.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciência Tecnologia Alimentos**, 24(2):207-11.2004.

FARIA, M.I.; FALÇÃO, C.A.C.; TÓRTORA, J.C.O. Contaminação Microbiana de alface de cultivo tradicional e hidropônico, no Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, 19(133):104-09.2005.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, PRG.; FONSECA M.C.M. Produtividade e acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes. **Horticultura Brasileira**, 20(2): 195-200. 2002.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, 33:85-102.1996.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia e Segurança Alimentar. Porto Alegre. Artmed. 424p.2002.

FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. Atheneu. São Paulo.182p.2003.

FRANCYS, G.A., THOMAS, C., O'BEIRNE, D. The microbiological safety of minimally processed vegetables. **International Journal Food Science Techonology**, 34:1-22.1999.

ISONHOOD, J.H. DRAKE, M. *Aeromonas* species in food. **Jornal Food Protection**, 65(3): 572-82.2002.

IBRAHIM, R.; OSMAN, A.; SAARI, N.; RAHMAN, R.A.; Effect of several packaging films on biochemical characteristics and microbiological counts of shredded cabbage at different storstge concitions. **Journal Food Agricultural and Environment**, 7(2):20-7.2005.

JAY, J.M. Microbiologia de Alimentos. 6<sup>a</sup> Edição. New York. Chapman Hall. 711p.2005.

JUNQUEIRA, A.H.; LUENGO, R.F.A. Mercado diferenciado de hortaliças. **Horticultura Brasileira**, 18(2):12-16 2000.

KANEKO, K.; HAYASHIDANI, H.; TAKAHASHI, K.; SHIRAKI, L.; LIMA-WONG PRANEE, S.; OGAWA, M. Bacterial contamination in the environment of food factories processing ready-to-eat fresh vegetables. **Journal Food Protection**, 62:800-804.1999.

KIM, S.H.; WEI, C.I.; TZOU, Y.M.; AN, H. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma **Journal Food Protection**, 68(10):2022-2029.2005.

KING, A.D.; MAGNUSSON, J.A.; TÖROK, T.; GOODMAN, N. Microbial flora and storage quality of partially processed lettuce. **Journal Food Science**, 56:459-461.2005.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, Jr W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. MEDSI. São Paulo 5ª Edição.1100p.2001.

KLUGE, R.; COSTA, R.A.; VITTI, M.C.D.; ONGARELLI, M.G.; JACOMINO, A.P.; MORETTI, C.L. Armazenamento refrigerado de beterraba minimamente processadas em diferentes tipos de corte. **Ciência Rural Santa Maria**, 36(1):263-270.2006.

LADO, B.H, YOUSEF, A.E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. **Microbes and Infection**, 4:433-40.2002.

LANA, M.M. Aspectos da fisiologia de cenoura minimamente processada. **Horticultura Brasileira**, 18(3):154-8. 2000.

LIMA, K.S. LIMA, A. L. S.; LUCHESE, R. H.; GODOY, R. L. O.; SABAA-SRUR, A. U. O. Cenouras Minimamente processadas em embalagens com atmosfera modificadas e tratadas com radiação gama: avaliação microbiológica, físico-química e química. **Ciência Tecnologia Alimentos**, 23(2):40-250, 2003.

LIMA, A .S.; RAMOS, A.L.D.; MARCELLINI, P.S.; BATISTA, R.A.; FARAONI, A.S. Adição de agentes antiescurecimento, antimicrobiano e utilização de diferentes filmes plásticos, em mamão minimamente processado. **Revista Brasileira de Fruticultura de Jaboticabal**, 27(1):149-52.2005.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, 14(9): 413-420.2006.

MARTINS, S.C.S.; LIMA, J.R.; ALMADA, J.S.; PEREIRA, A.I.B. Screening de linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos em alimentos de origem animal do estado do Ceará, Brasil. **Higiene Alimentar**, 17(104/105):71-76.2003.

MEAD, P.S.. *et al.* Food-related illness and Death in the United State. **Emerging. Infection Disease**, 5:607-25.1999.

MENG, J. DOYLE, M.P. Introduction microbiological food safety. **Microbes and infection** 4:395-7.2002.

MORETTI, CL. Processamento mínimo de hortaliças: alternativa viável para a redução de perdas pós-colheita e agregação de valor ao agronegócio brasileiro. **Horticultura Brasileira**, 17(1): 123-127. 1999.

MURRAY, P.R. ; DREW, W.L.; KOBAYASHI, G. L.; THOMPSON, J. H. Microbiologia Médica. Guanabara Koogan.2000.

NASCIMENTO. I.M.S. MARQUES. C.M.P. Avaliação microbiológica de saladas *in natura* oferecidas em restaurantes self-service de São Luís-Ma. **Higiene Alimentar**, 12(57):41-4.1998.

NASCIMENTO, A.R.; SILVA, N.; CATAZONI, M.P.L.M.; SILVA, K.C. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. **Brazilian Journal Food Technology**, 6(1):63-68.2003.

NASCIMENTO, A.R.; FILHO, J.E.M.; FILHO, V.E.M.; MARTINS, A.G.L.A.; MARINHO, S.C.; SERRA C.L.M; ALVES, L.M.C. Avaliação da sensibilidade de antimicrobianos a cepas de Enterobactérias isoladas de amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializadas na cidade de São Luís – Ma. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 23(2):253-72.2005.

NGUYEN-THE, C.; CARLIN F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, 34-371-401.1994.

NOVAK, F.R.; ALMEIDA, J.A.G.; ASENSI, M.D.; MORAES, B.A.; RODRIGUES, D.P. Resistência antimicrobiana de coliformes isolados de leite humano ordenhado. **Cadernos de Saúde Pública**, 17(3):713-17.2001.

OHLSSON, T. Minimal processing-preservation methods of the future: an overview. **Trends in Food Science Technology**, 5.341-4.1994.

OLIVEIRA, A.P.; SILVA, V.R.F.; SANTOS, C.S.; ARAÚJO, J.S.; NASCIMENTO, J.T. Produção de coentro cultivado com esterco bovino e adubação mineral. **Horticultura Brasileira**, 20(3)77-9.2002.

OLSEN, S.J. Surveillance for foodborne disease outbreaks- United States 1993- 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 24(2):207-11.2004.

PACHECO, M. A. S. R.; FONSECA, Y. S. K.; DIAS, H, G. G.; CÂNDIDO, V. L. P.; GOMES, A. H, S. ARMELIN, I. M. Condições higiênico sanitárias de verduras e legumes comercializados na CEAGESP de Sorocaba. **Higiene Alimentar**, 16(101):50-5.2002.

PATERSON, D.L. Recommendation for treatment of severe infection caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL). **Clinical Microbiology Infection**, 6:460-3. 2000.

PATERSON, D.L.; WEN-CHIEN, K.; GOTTBORG, A.V.; CASELLAS, J.M.; MULAZIMOGLU, L.; KLUGMAN, K.P.; BONOMO, R.A.; RICE.; L.B.; McCOMARCK, J.G.; YU, V.L. Outcome of cephalosporin treatment for serious infection due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. **Journal Clinical Microbiology**, 39(6):2206-2212.2001.

PAULA, P.; RODRIGUES, P.S.S.; TÓRTORA, J.C.O.; UCHOA, C.M.A.; FARAGE, S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de

restaurantes self-service, de Niterói, RJ. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, 36(4):535-537. 2003.

PEREIRA, A.S.; CARMO FILHO, J.R.; TOGNIM, M.C.T.; SADER, H.S. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39(4):300-8.2003.

PHILLIPS, C.A. Review: Modified Atmosphere Packing and its effects on the microbiological quality and safety of produce. **International Journal Food Science Technology**, 31: 463-79, 1996.

PILON, L. Estabelecimento da vida útil de hortaliças minimamente processadas sob atmosferas modificadas e refrigeração. Dissertação e Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Piracicaba. São Paulo. 128 p. 2003.

PINHEIRO, N.H.S. FIGUEIREDO, E.A.T.;3, FIGUEIREDO, R.W.; MAIA, G.M.; SOUZA, P.H.M.. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Revista Brasileira de Fruticultura de Jaboticabal**, 27(1):153-6.2005.

PODSCHUM R, ULMANN U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, 11:589–603. 1998.

POLITI, L.; TASSIOS, P.T.; LAMBIRI, M.; KANSOUZIDOU, A.; PASIOTOU, M.; VATOPOULOS, A.C.; MELLOU, K.; LEGAKIS. N.J.; TZOUVELEKIS, L.S. Repeated occurrence of diverse extended-spectrum  $\beta$ -lactmases in minor serotypes of food-boorne *Salmonella entérica* subsp. *enterica*. **Journal Clinical Microbiology**, 43(7):3453-3456.2005.

PORTE, A.; MAIA, L.H. Alterações Fisiológicas, Bioquímicas e microbiológicos de alimentos minimamente processados. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 19(1):105-18.2001.

RAGAERT, P.; VERBEKE, W.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Consumer perpection and choice of minimally processed vegetables and pacaged fruits. **Food Quality Preference**, 15:259-270.2004.

RESENDE, J.M.; COELHO, A.F.S.; CASTRO, E.C.; SAGGIN JÚNIOR, O.J.; NASCIMENTO, T.; BENEDETTI, B.C. Modificações sensoriais em cenoura minimamente processada e armazenada sob refrigeração. **Horticultura Brasileira**, 22(1):47-150. 2004.

ROSA, O.O. Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processados comercializados em supermercados. Larvas. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Lavras.2002.

SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; MITCHELL, R.T. The microbiological examination of ready-to-eat organic vegetables from retail establishments in the United Kingdom. **Letters in Applied Microbiology**, 33:434-9.2001.

SANDERS, W.E.; SANDERS, C. *Enterobacter* spp: Pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical Microbiology Reviews**, 10(2):220-41.1997.

SANT'ANA, A.; AZEVEDO, D.P.; COSTA, M.; MACEDO, V. Análise de perigos no processamento mínimo de hortaliças. **Higiene Alimentar**, 16(101):56-8.2002.

SANTANA, L.R.R.; CARVALHO, R.D.S.; LEITE, C.C.; ALCÂNTARA, L.M.; OLIVEIRA, T.W.S.; RODRIGUES, B.M. Qualidade física, microbiológica e parasitológica de alfaces (*Lactuca sativa*) de diferentes tipos de sistema de cultivo. **Ciência Tecnologia Alimentos**, 26(2):264-269.2006.

SARANTOPOULOS, C.I.G.L.; OLIVEIRA, M.L.; OLIVEIRA, T.B.F. Avaliação de embalagem de hortaliças folhosas minimamente processadas do mercado brasileiro. **Brazilian Journal Food Technology**, 5:53-60.2002.

SATO, G.S. O mercado de hortaliças e frutas minimamente processados no Brasil. **Reunião Anual do Instituto Biológico**, São Paulo. 2005.

SCHLIME, D.V. ROONEY, M.L. Packing of minimally processed fruit and vegetables. In: WHILEY, R.C. Minimally processed refrigerated fruits and vegetables. London. Chapman and Hall. 357p. 1994.

SCHMIDT, F.L.; VITALI, A.A.; SILVA, N. Redução da contaminação microbiológica em pimenta-do-reino em grão por tratamento térmico. **Braz. J. Food Tech**, 3:79-82..2002.

SCHWARTZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal Antimicrobial Agents**, 17:432-7.2001.

SHEN, D.; WINOKUR, P.; JONES, R.N. Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in Beijing China. **International Journal Antimicrobial Agents**, 18:185-8. 2001.

SILVA, N.; SILVEIRA, N.F.A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M.M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em hortaliças e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência Tecnologia Alimentos**, 23(2):167-73.2003.

SILVA, N. JUNQUEIRA, V.C.A. SILVEIRA, N.F.A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2951, 1997.

SIQUEIRA, I.M.C. *et al.* Avaliação microbiológica de saladas cruas e cozidas servidas em restaurantes industriais da grande Belo Horizonte. **Higiene Alimentar**, 11(49):36-9.1997.

SOARES, J.B., MAIA, A.C.F. Água. Microbiologia e Tratamento. EDUFC. Fortaleza.206p.1999.

SOLBERG, M.; BUCKALEW, J.J.; CHEU, C.M.; SCHAFFER, D.W.; O'NEILL, K.; McDOWELL, J.; POST, L.S.; BODERCK, M. Microbiological safety assurance system for foodservice facilities. **Food. Technol**, 12:68-73.1998.

SORIANO, J.M.; RICO, H.; MOLTO, J.C.; MANES, J. Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. **International Journal of Food Microbiology**, 58(1):123-128.2000.

SOUZA, R.A.M. Mercado para produtos minimamente processados no Brasil. **Informações Econômicas**, 31(3):7-18. 2001.

STÜRMER, T.; ERB, A.; MARRE, R.; BRENNER, H. Prevalence and determinants of colonization with antibiotic-resistant *Escherichia coli* in unselected patients attending general practitioners in Germany. **Pharmacoepidemiol. Drug. Saf**, 13:303-308.2004.

SZABO, E.A.; SCURRAH, K.J.; BURROWS, J.M. Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce. **Letters in Applied Microbiology**, 30:456-60.2000.

TAKAYANAGUI, O. M.; OLIVEIRA, C.O.; BERGAMINI, A.M.M.; CAPUANO, I.M.; OKINO, M.H.T.; FEBRÔNIO, L.H.P.; SILVA, A.A.M.C.C.; OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO, E.G.A.; TAKAYANAGUI, A.M.M. Fiscalização de verduras comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34(1):37-41.2001.

TEIXEIRA, G.H.A. DURIGAN, J.F.; MATTIUZ, B.; ROSSI JUNIOR, O.D. Processamento mínimo de mamão formosa. **Ciência Tecnologia Alimentos**, 21(1):47-50.2001.

THREFALL, E.J.; WARD, L.R.; FROST, J.A.; WILLSHAW, G.A. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 62:1-5.2000.

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

TOURNAS, V.H.; HEERES, J.; BURGESS, L.. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. **Food Microbiol**, 23:p. 684-688. 2006a.

TOURNAS, V.H.; KATSODAS, E.; MIRACCO, E.J. Moulds, yeasts and aerobic plate counts in ginseng supplements. **International Journal of Food Microbiology**, 108: 178-181. 2006b.

VENTURINI, M.E.; ORIA, R.; BLANCO, D. Microflora of two varieties of sweet cherries: Burlat and Swetheart. **Food Microbiol**, 19:15-21.2001.

VISWANATHAN, P.; KAUR, R. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. **Inter J Hyg Envir Health**, 203:205-13. 2001.

VITTI, M.C.D.; KLUGE, R.A.; GALLO, C.R.; MORETTI, C.L.; JACOMINO, A.P. Efeito do momento de sanitização sobre atributos físico-químicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. **Horticultura Brasileira**, 22(4): 718-721. 2004.

YATES, C., AMYES, S. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in non-typhoidal *Salmonella* spp. isolated in the UK are now a reality: why late arrival ? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 56:262-4.2005.

WEISSINGER, W.R.; CHATARAPANONT,W.; BEUCHAT, L.R. Survival and growth of *Salmonella* Baidon in sheredded lettuce and diced tomatoes and effectiveness of chlorinated water as a sanitizer. **International Journal of Food Microbiology**, 62:123-1312000.

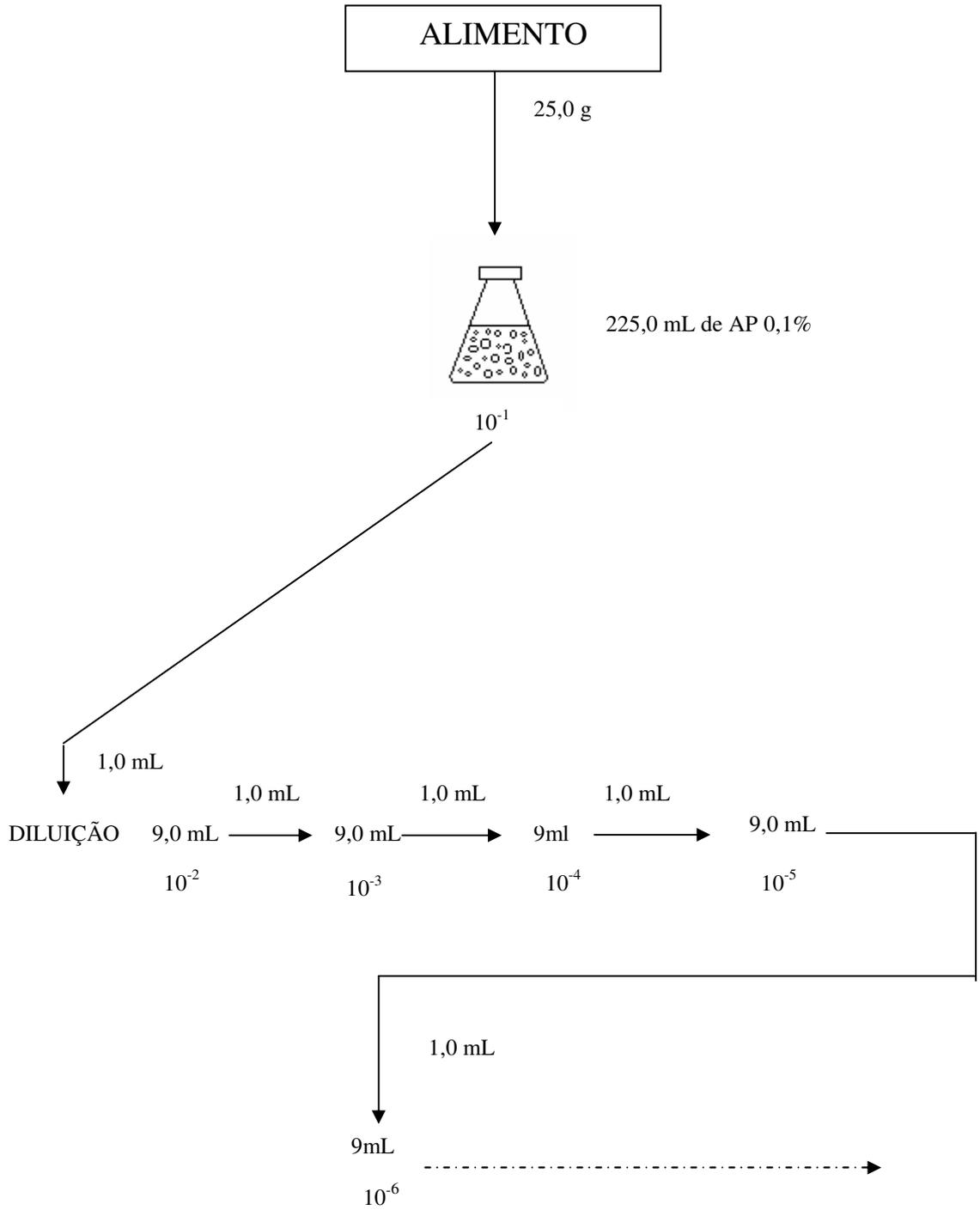
WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D.D.; MCDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infection**, 4:405-12.2002.

WOJCIK-STOPCZYNSKA, B. Microbiological quality of minimally processed vegetable salads. **Rocz Panstw Zalk Hig**, 55(2):p.139-45.2004.

# ANEXOS

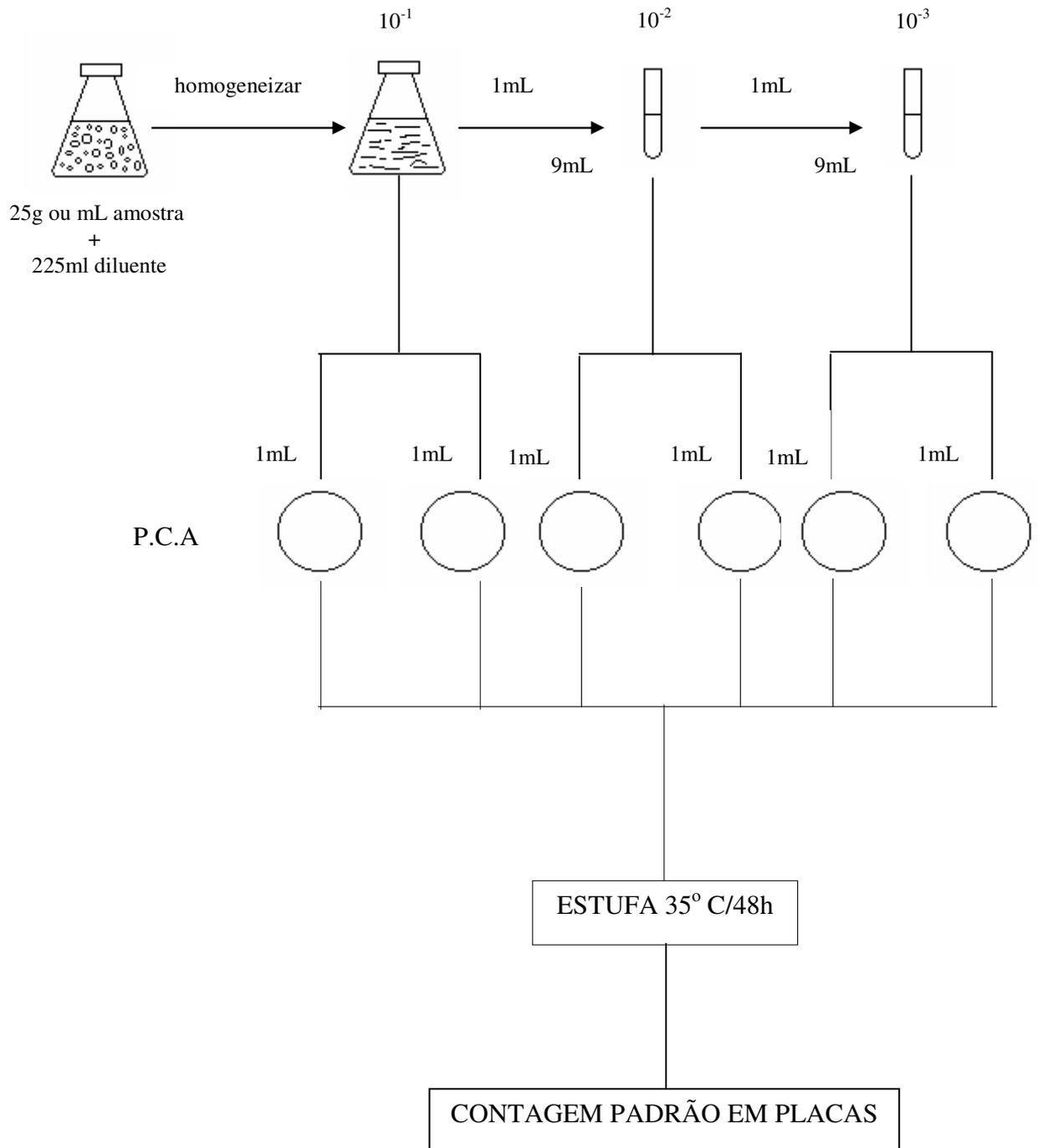
# ANEXO 1

## Diluições sucessivas



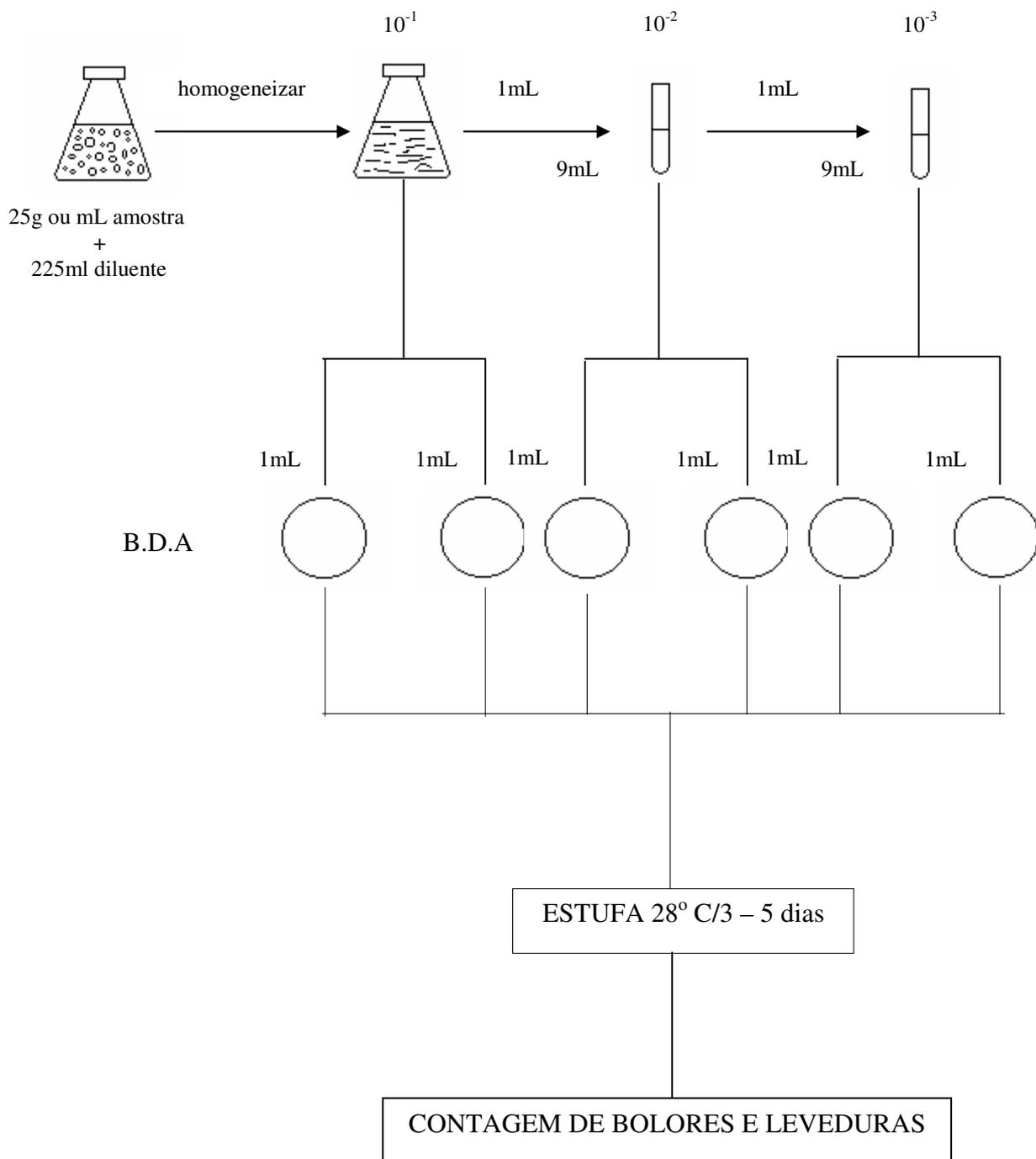
## ANEXO 2

### Contagem Padrão em Placas



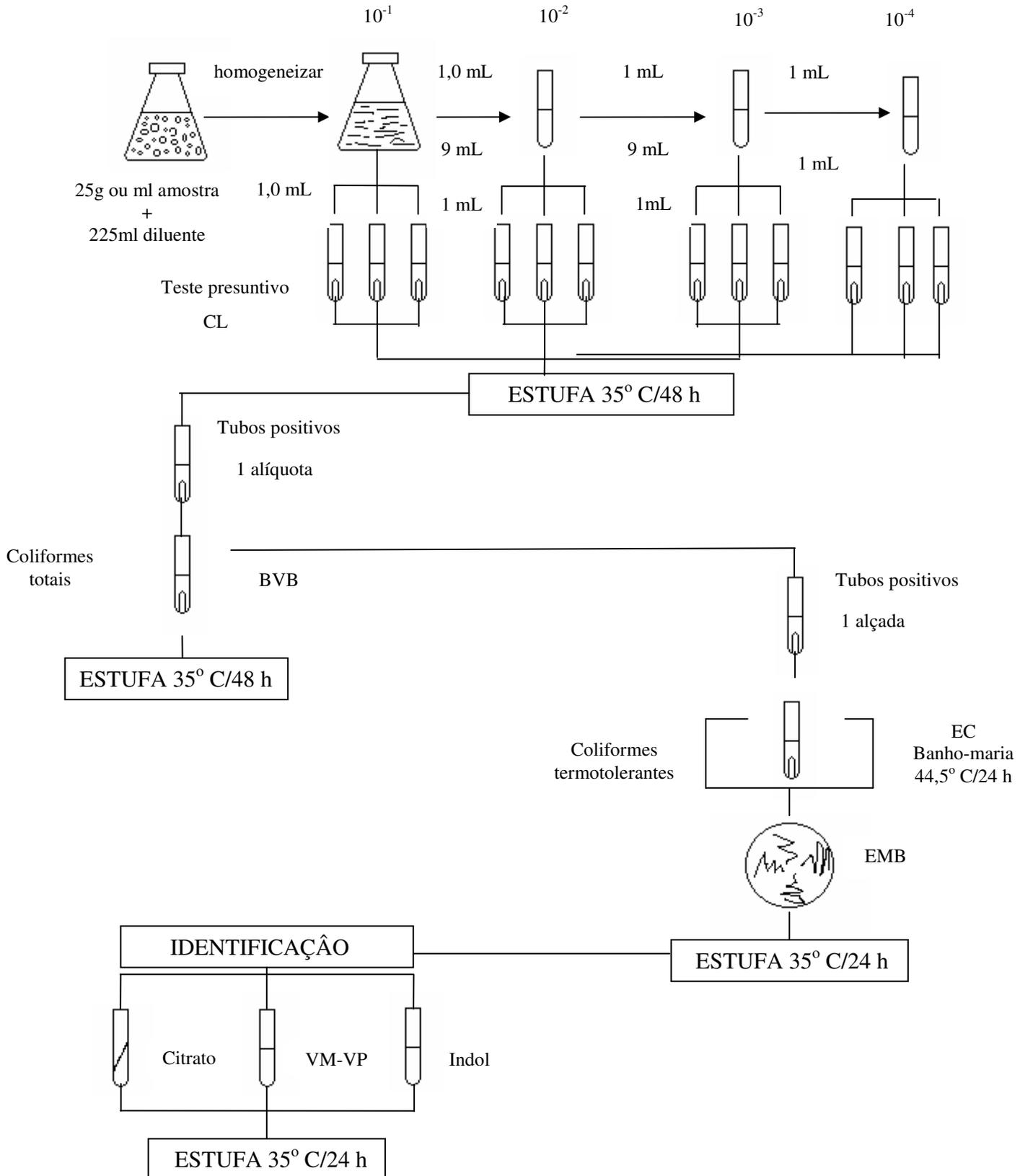
### ANEXO 3

## Contagem de Bolores e Leveduras



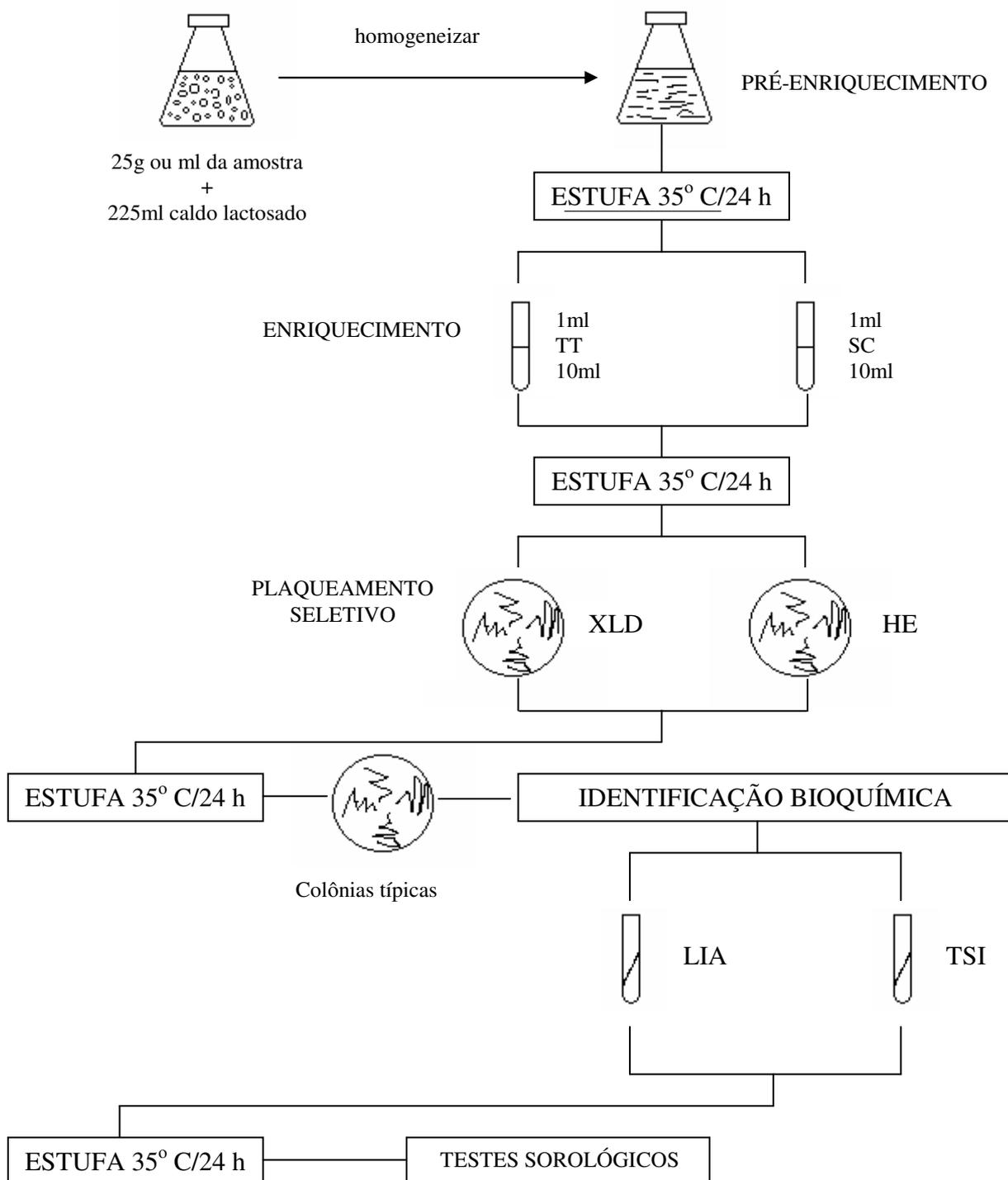
## ANEXO 4

### Técnica do Número Mais Provável (NMP)



## ANEXO 5

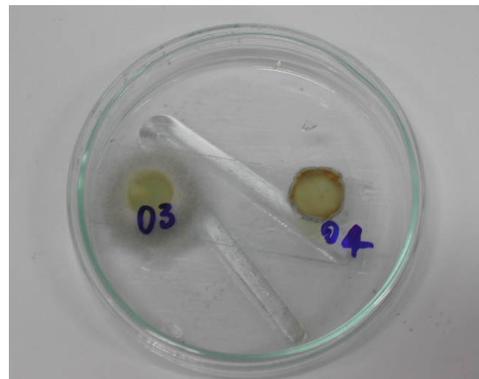
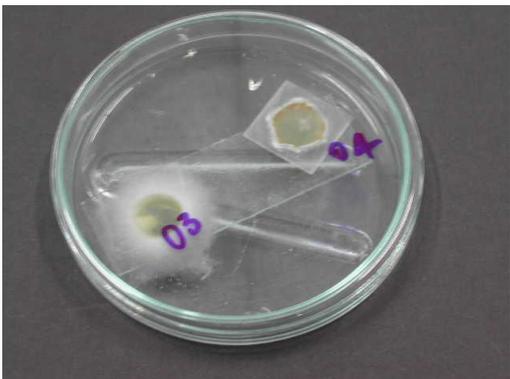
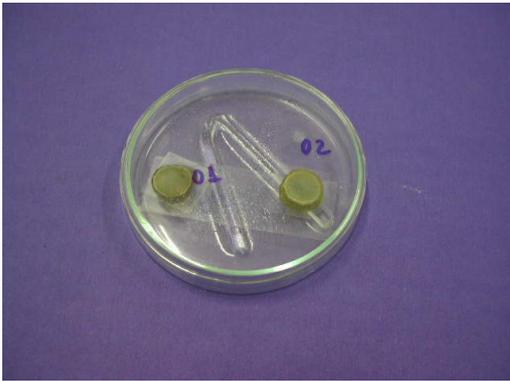
### Técnica de análise de *Salmonella*



**ANEXO 6**  
**FOTOS DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS**



**ANEXO 7**  
**FOTOS DE MICROCULTIVO DE BOLORES ISOLADOS DE HORTALIÇAS**  
**MINIMAMENTE PROCESSADAS.**



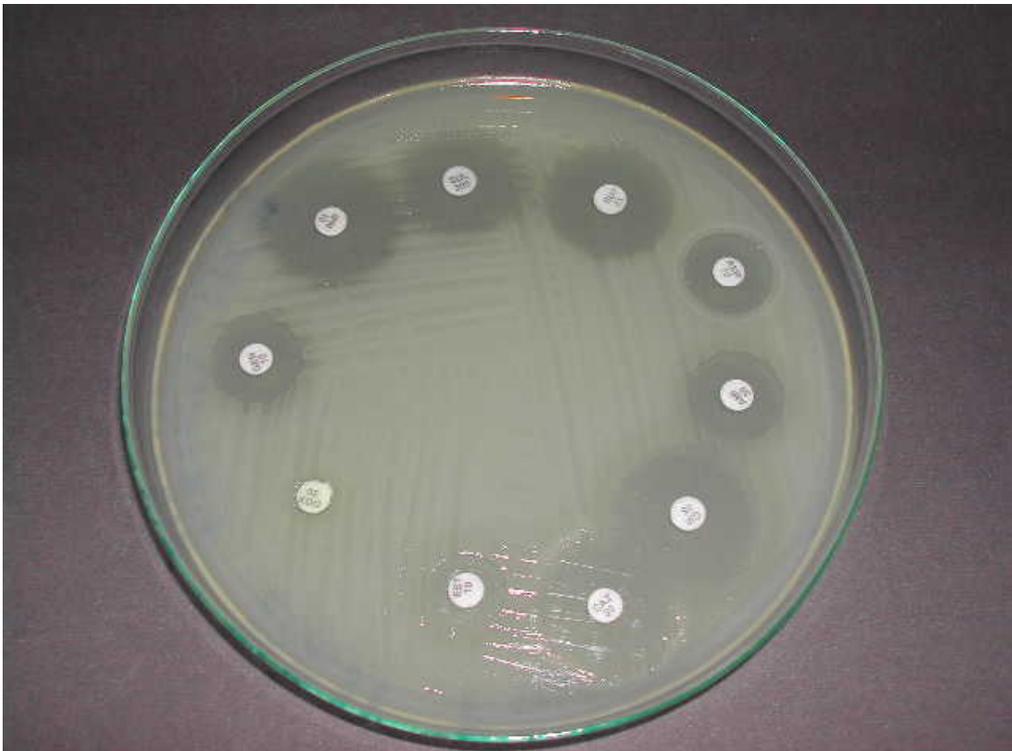
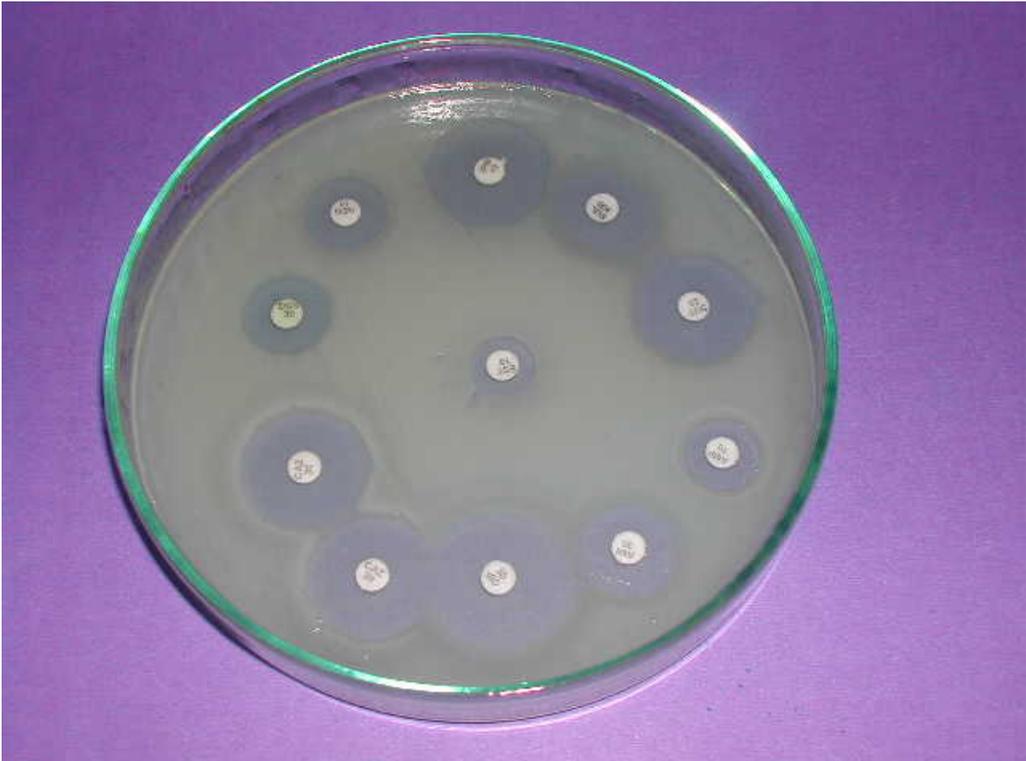
**ANEXO 8**  
**FOTOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE HORTALIÇAS MINIMAMENTE**  
**PROCESSADAS.**





**ANEXO 9**  
**FOTOS DOS TESTES DE SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE**  
**HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS.**





**ANEXO 10**  
**PONTOS DE CORTE DOS ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NOS TESTES DE**  
**SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE HORTALIÇAS**  
**MINIMAMENTE PROCESSADAS**

**Pontos de Corte dos antibióticos**

Droga	MIC(ug/mL)			Halo (mm)		
	S	I	R	S	I	R
Amicacina	≤16	32	≥64	≥17	15-16	≤14
Ampicilina	≤8	16	≥ 32	≥17	14-16	≤13
Ceftazidima	≤ 8	16	≥32	≥18	15-17	≤14
Ciprofloxacina	≤1	2	≥4	≥21	16-20	≤15
Imipenem	≤4	8	≥16	≥16	14-15	≤13
Estreptomicina				≥10	7-9	≤6
Gentamicina	≤4	8	≥16	≥15	13-14	≤12
Doxiciclina	≤4	8	≥16	≥19	15-18	≤14
Sulfonamida	≤256	1	≥512	≥17	13-16	≤12
Sulf-Trim	≤2/38		≥4/16	≥16	11-15	≤10
Cefalotina	≤8	16	≥32	≥18	15-17	≤14
Cefepime	≤8	16	≥32	≥18	15-17	≤14
Ceftriaxona	≤8	16-32	≥64	≥21	14-20	≤13
Meropenem	≤4	8	≥16	≥16	14-15	≤13

S-sensível; I-intermediário; R-resistente.