

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Incidência de *Salmonella* spp. em caqui (*Diospyrus kaki*) e  
crescimento de *S. Enteritidis* na casca e na polpa dessa fruta**

**Ana Carolina Bortolossi Rezende**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência  
e Tecnologia de Alimentos**

**Piracicaba**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Ana Carolina Bortolossi Rezende**  
**Bióloga**

**Incidência de *Salmonella* spp. em caqui (*Diospyrus kaki*) e crescimento de *S.*  
*Enteritidis* na casca e na polpa dessa fruta**

Orientador:  
Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Ciências. Área de concentração:  
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba**  
**2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Rezende, Ana Carolina Bortolossi

Incidência de *Salmonella* spp. em caqui (*Diospyrus kaki*) e crescimento de *S. Enteritidis* na casca e na polpa dessa fruta / Ana Carolina Bortolossi Rezende. - - Piracicaba, 2007.

61 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.  
Bibliografia.

1. Bactérias patogênicas 2. Caqui 3. Cascas (planas) 4. Contaminação de alimento  
5. Polpa 7. Salmonella - Incidência I. Título

CDD 664.804451

**“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”**

**DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Maury e Marta, que sempre torceram e acreditaram em mim, pois sem eles nada teria sido possível.*

*Ao meu namorado Roberto, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus pela força e sabedoria, principalmente nos momentos de desafios.*

*À minha família pelo carinho e apoio, especialmente meus pais, e meu irmão Felipe.*

*À Dra. Maria Fernanda P. P. M. de Castro, pela oportunidade, confiança, paciência e orientação.*

*Ao Professor Dr. Ernani Porto, pela atenção e orientação.*

*Ao ITAL, principalmente ao departamento de Microbiologia e ao Grupo de Engenharia Pós-Colheita (GEPC), que permitiram a realização deste trabalho.*

*À Dra. Eliane Ap. Benato pela colaboração na realização deste trabalho.*

*Aos estagiários e todos os funcionários do ITAL, especialmente do Departamento de Microbiologia e do GEPC.*

*Ao Professor Dr. Cláudio Rosa Gallo, pela colaboração.*

*Especialmente à amiga Cristiane Akemi Uchima, pela amizade, companheirismo, pela força, por ter passado tudo o que eu passei e pelos momentos de risadas no decorrer deste trabalho.*

*À minha prima, Maíra Rezende pela atenção e troca de experiências.*

*A todos os meus amigos que mesmo distante estiveram torcendo por mim.*

*À bibliotecária Beatriz Helena Giongo, pela correção deste trabalho.*

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Caqui.....	15
2.2 <i>Salmonella</i> spp - características, importância.....	16
2.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	20
2.4 Incidência e surtos relacionados com <i>Salmonella</i> spp. em frutas.....	21
2.5 Crescimento e multiplicação de <i>Salmonella</i> spp. em frutas.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Incidência de <i>Salmonella</i> spp. na superfície de caqui .....	26
3.1.1 Amostras.....	26
3.1.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	26
3.1.3 Confirmação de <i>Salmonella</i> spp.....	28
3.2 Curvas de Crescimento.....	29
3.2.1 Atividade de água ( <i>A<sub>w</sub></i> ) da casca e da polpa do caqui.....	29
3.2.2 Frutas.....	29
3.2.3 Cultura bacteriana.....	29
3.2.4 Preparo do inóculo.....	30
3.2.5 Preparo das Amostras de Polpa e de Casca.....	30
3.2.6 Inoculação da polpa e da casca com <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	31
3.2.7 Parâmetros de crescimento.....	31
3.2.7.1 Tempo de Geração (TG).....	32
3.2.7.2 Taxa de Crescimento Exponencial (T.C.E).....	32
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	34
5.2 Avaliação da Atividade de água ( <i>A<sub>w</sub></i> ) da casca e da polpa.....	36



5.3 Polpa e casca como substrato para crescimento de <i>S. Enteritidis</i> .....	37
5.3.1 Crescimento de <i>S. Enteritidis</i> a 10°C .....	37
5.3.2 Crescimento de <i>S. Enteritidis</i> a 20°C.....	39
5.3.3 Crescimento de <i>S. Enteritidis</i> a 30°C.....	41
5.3.4 Tempo de Geração e crescimento de <i>S. Enteritidis</i> na casca e na polpa.....	43
6 CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO.....	54

## RESUMO

### **Incidência de *Salmonella* spp em caqui (*Diospyrus kaki*) e crescimento de *S. Enteritidis* na casca e na polpa dessa fruta**

O consumo mundial de produtos frescos tem aumentado nos últimos anos, devido a preocupação da população com a saúde. Entretanto, a busca por uma alimentação mais saudável vem aumentando o risco de surtos de doenças veiculadas por frutas e hortaliças, tendo em vista, que estes alimentos são geralmente consumidos *in natura*. Embora qualquer patógeno possa ser um problema potencial nesses produtos, *Salmonella* spp. tem grande relevância em saúde pública. A contaminação potencial por esse patógeno em frutas, é possível devido a contaminação cruzada e falta de boas práticas agrícolas durante o cultivo, colheita, manuseio e distribuição. Nas frutas de baixa acidez, dentre as quais está o caqui, *Salmonella* spp pode ainda ter condições para sobreviver e se multiplicar. O caqui é uma fruta de relevante importância sócio-econômica, com crescente demanda para exportação, no entanto, o mercado importador está cada vez mais exigente em relação a segurança alimentar. No Brasil, não existem informações sobre a ocorrência de *Salmonella* spp em caqui, bem como, a respeito do comportamento desse patógeno na polpa e na casca dessa fruta. Desse modo, os objetivos do presente estudo foram: (1) verificar a incidência de *Salmonella* spp na superfície do caqui, (2) estudar a sobrevivência e multiplicação de *S. Enteritidis* na polpa e na casca dessa fruta armazenada a diferentes temperaturas de incubação. Para tanto, em 2005 foram coletadas 77 amostras de caqui Fuyu e 80 amostras de caqui Rama Forte no varejo na cidade de Campinas-SP e a mesma proporção no ano de 2006. Adicionalmente em 2006 também foram coletadas 134 amostras de caqui Rama Forte e 134 amostras de caqui Fuyu no CEAGESP, na cidade de São Paulo. A pesquisa para *Salmonella* spp foi realizada pelo sistema BAX®, que se baseia na reação da polimerase em cadeia (PCR). Os parâmetros de crescimento de *S. Enteritidis* (duração da fase lag, taxa de crescimento exponencial e tempo de geração) foram obtidos dos dados experimentais. Os resultados mostraram que das 582 amostras analisadas 5 (0,9%) foram positivas para *Salmonella* spp, indicando que condições sanitárias durante o crescimento no campo (água de irrigação, adubo, etc.), colheita, condições de transporte e armazenamento, assim como a manipulação das frutas podem levar a contaminação. Os dados de crescimento obtidos para *Salmonella* mostram que este patógeno pode sobreviver e se multiplicar tanto na polpa quanto na casca do caqui, nas duas variedades estudadas e mesmo a baixas temperaturas.

Palavras-chave: *Salmonella*; Caqui; Crescimento; Incidência.

## ABSTRACT

### **Incidence of *Salmonella* spp. in persimmon (*Diospyrus kaki*) and growth of *S. Enteritidis* on the peel and in the pulp of this fruit.**

The worldwide consumption of fresh produce has increased in the last years, due to an increased concern among the population about health. However, the search for more healthful eating habits has also increasing the risk of acquiring a foodborne disease, as these products generally are consumed raw. Although any pathogen can be a potential problem in these produces, *Salmonella* spp. is of great relevance in public health. The potential contamination for this pathogen in fruits, is possible due to cross contamination and poor agricultural practices during harvest, handling and distribution. In low acid fruits, amongst which is persimmon, *Salmonella* spp can still have conditions to survive and to multiply. The persimmon is a fruit of great economic importance, with increasing demand for exportation, however, the import market has an increase demand for food safety. There are not in Brazil, information about the occurrence of *Salmonella* spp in persimmon, as well as, information regarding the behavior of this pathogen in the pulp and the rind of this fruit. Thus, the objectives of the present study had been: (1) to verify the incidence of *Salmonella* spp on the surface of persimmon, (2) to study the survival and multiplication of *S. Enteritidis* on the peel and in the pulp of this fruit stored at different temperatures of incubation. For this survey in 2005 and 2006 harvests, 77 samples and 80 samples of 'Fuyu' and 'Rama Forte' persimmon respectively collected in the retail in Campinas city - SP. Additionally in 2006, 134 samples of each 'Rama Forte' and 'Fuyu' persimmon were also collected in the CEAGESP, in São Paulo city. The analyses had been carried using the BAX® system (Dupont/Qualicon), that is based on the Polymerase Chain Reaction (PCR). The parameters of growth during the evaluation of the ability of growth of *S. Enteritidis* (lag phase duration, exponential growth rate and generation time) were obtained from experimental data. *Salmonella* spp were detected in five samples (0,9%) of those analysed. The growth data obtained for *Salmonella* indicated that this pathogen can survive and multiply on the peel as well as in the pulp in the two studied varieties and even at low temperatures.

**Key words:** *Salmonella*; Persimmon; Growth; Incidence.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema Bax® e acessórios para pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	27
Figura 2 - Etapas da metodologia requerida para uso do BAX® para as análises de <i>Salmonella</i> spp na superfície de caqui.....	27
Figura 3 - Crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis (log UFC/g) na casca de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 10°C. ....	38
Figura 4 - Crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis (log UFC/g) na polpa de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 10°C.....	38
Figura 5 - Crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis (log UFC/g) na casca do caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 20°C.....	40
Figura 6 - Crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis (log UFC/g) na polpa de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 20°C.....	40
Figura 7 - Crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis (log UFC/g) na casca do caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 30°C.....	42
Figura 8 - Crescimento de <i>Salmonella</i> Enteritidis (log UFC/g) na polpa do caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 30°C.....	42

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Surto de doenças de origem alimentar causadas por <i>Salmonella</i> .....	20
Tabela 2 - Incidência de <i>Salmonella</i> spp na casca de frutos de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte'.....	34
Tabela 3 - Avaliação da Atividade de água (Aw) da casca dos caquis armazenados a 10°C durante 10 dias.....	36
Tabela 4 - Avaliação da Atividade de água (Aw) da polpa dos caquis armazenados a 10°C durante 10 dias.....	37
Tabela 5 - Tempo de geração (h) <sup>1</sup> para <i>Salmonella</i> Enteritidis na casca e na polpa de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' incubada a diferentes temperaturas.....	43
Tabela 6 - Taxa de crescimento exponencial (UFC/g/h), para <i>Salmonella</i> Enteritidis na polpa e na casca de caqui 'Fuyu' e 'Rama Forte' incubadas a diferentes temperaturas.....	44

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo mundial de produtos frescos tem aumentado nos últimos anos, devido à preocupação da população com a saúde. Entretanto, a busca por uma alimentação mais saudável vem aumentando o risco de surtos de doenças veiculadas pelos alimentos, tendo em vista, que estes produtos são geralmente consumidos *in natura* (MADDEN, 1992).

Sabe-se que produtos vegetais *in natura*, podem apresentar contaminantes microbiológicos, os quais podem causar doenças no homem, sendo os responsáveis por surtos de DTAs (doenças transmitidas por alimentos), como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outros (BENATO, SIGRIST; ROCHA, 2006; PENTEADO; LEITÃO, 2003). *Salmonella* aparece como o principal agente etiológico de surtos de origem alimentar nos EUA, no período de 1993-1997, com 32.610 casos e 13 mortes, o que representa 44,8% do número total de surtos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2000), sendo que nas duas últimas décadas, *Salmonella* Enteritidis tem causado um crescimento pandêmico mundial, o que tem feito de *S. Enteritidis* o mais comum dos sorotipos de salmonela não tifóide em muitos países e tem proporcionado novo impulso para a tentativa de segurança alimentar em toda parte (SAEED et al., 1999).

Dados apresentados pelo CDC (2000) têm indicado uma freqüência crescente de alimentos de origem vegetal, principalmente, frutas e hortaliças em números significativos dos casos e surtos de doenças de origem alimentar. Por ser um dos três maiores países produtores mundiais de frutas, esses dados são de extrema importância para o Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DA FRUTA – IBRAF, 2007).

Penteado e Leitão (2003) estudaram a incidência de *Salmonella* spp e *Listeria* spp em superfícies de frutas de baixa acidez (melão, melancia e mamão) e verificaram que as mesmas são bons substratos para a sobrevivência e multiplicação desses patógenos.

Com condições de pH semelhantes, o caqui (*Diospyrus kaki*) está entre as frutas que merecem destaque no mercado nacional. O Brasil apresenta uma área plantada

dessa fruta de aproximadamente 8134 hectares, com uma produção em torno de 158 mil toneladas (IBRAF, 2007). O Estado de São Paulo possui grande concentração da produção (SATO; ASSUMPÇÃO, 2002), tendo maior destaque as regiões de Mogi das Cruzes, Campinas, Itapeva e Sorocaba, responsáveis em conjunto por 88,83% e se destinam basicamente ao mercado interno, sendo de relevante importância sócio-econômica (MUÑOZ, 2002; SATO; ASSUMPÇÃO 2002; TIBA, 1996). A safra paulista inicia no final de janeiro com a variedade Taubaté (mais precoce), estendendo-se até junho com variedades mais tardias como Fuyu, Rama Forte e Guiombo. Existe um notável pico de safra, que ocorre nos meses de março e abril (SATO; ASSUMPÇÃO 2002).

A China é a maior produtora, com 1,7 milhão de toneladas, seguida do Japão com 270 mil toneladas e Coreia do Sul com 250 mil toneladas, enquanto que o Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial. Presente em oito Estados brasileiros, a cultura está mais desenvolvida nas regiões Sul e Sudeste (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA – IEA, 2007).

A cultura do caqui vem ganhando importância no Brasil, tanto pela área plantada quanto pela diversificação de regiões de plantio, o que tem aumentado as quantidades ofertadas do produto no mercado interno e, graças à organização de produtores, para a exportação. A fruta é comumente consumida *in natura* (IEA, 2007).

Contudo, não basta ter quantidade, é preciso ter qualidade e garantir a inocuidade do alimento. Esses quesitos são cada vez mais exigidos por consumidores do mundo todo, uma vez que dentre os surtos mais comuns de doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs), estão: gastroenterites, hepatite, intoxicações, podendo em casos mais graves, provocar até a morte do consumidor. Os patógenos responsáveis pelas DTAS podem contaminar as frutas em qualquer etapa da cadeia produtiva. Deve-se salientar que a questão de higiene dos alimentos é um problema mundial e que, mesmo nos países desenvolvidos, em torno de 5% das DTAs têm origem no consumo de produtos vegetais contaminados a partir do solo, da água de irrigação, dos adubos orgânicos, das condições de transporte e armazenamento, ou durante a manipulação facilitando a contaminação cruzada (GERMANO; GERMANO, 2003).

No Brasil são escassas as informações sobre DTAs devido à ingestão de frutas contaminadas e sabe-se que as condições higiênico-sanitárias durante as etapas de produção como colheita, armazenamento, transporte e distribuição nem sempre são as mais adequadas (PENTEADO; LEITÃO, 2003). As frutas de baixa acidez, dentre as quais está o caqui, podem facilitar a multiplicação de patógenos presentes se entrarem em contato com uma fonte contaminante, sendo então de grande importância o estudo da incidência de patógenos causadores de doenças de origem alimentar nas frutas.

Com base nestas considerações, desenvolveu-se a presente pesquisa com o objetivo de verificar a incidência de *Salmonella* spp em caqui em nível de varejo e atacado nas variedades Rama Forte e Fuyu, assim como o crescimento de *Salmonella* Enteritidis na polpa e na casca dessas variedades mantidas sob diferentes condições de incubação.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Caqui

Proveniente da Ásia, o caqui (*Diospyrus kaki*) chegou ao Brasil onde se aclimatou muito bem e passou a frutificar ainda melhor do que em seus países de origem, tornando-se importante produto de exploração comercial (NICOLETI, 2005; TIBA, 1996). Sua introdução no Brasil ocorreu no final do século XIX trazido por imigrantes franceses, onde passou a ser explorado comercialmente. Tendo chegado a São Paulo em 1890, a expansão da cultura no país só ocorreu em 1920 com a chegada de imigrantes japoneses, que trouxeram outras variedades e o domínio da produção (SATO; ASSUMPÇÃO, 2002).

O caqui é uma fruta mais conhecida entre os povos de descendência oriental. No entanto, o hábito de seu consumo vem se popularizando pelo mundo, inclusive no Brasil.

O caqui é uma fruta climatérica, amadurecendo, portanto após a colheita. Pode ser dividido em dois grandes grupos: PC – aqueles que não mudam a cor da polpa quando polinizados; PV – aqueles que possuem a polpa clara quando sem sementes (não polinizados) e escura, quando com semente (polinizado), podendo também ser dividido em adstringentes (Rama Forte) e não adstringentes (Fuyu) (BENATO; SIGRIST; ROCHA, 2006; TIBA, 1996). No entanto, no Brasil são classificados em três grandes grupos: sibugaki (taninoso, com ou sem semente, de coloração quase vermelha), amagaki (doces ou não taninosos, de polpa firme e mais amarelos quando maduros), e os variáveis (inclui as variedades sem sementes com polpa taninosa e as variedades com uma ou várias sementes, não taninosas, {de polpa parcial ou totalmente escura}), denominando-se caqui “chocolate” (BENATO; SIGRIST; ROCHA, 2006; TIBA, 1996). Os frutos taninosos, geralmente necessitam de tratamentos pós-colheita de destanização para tornarem-se aptos ao consumo (BENATO; SIGRIST; ROCHA, 2006).

O conteúdo de açúcares totais no caqui varia de 10,2 a 19,6% em frutos de variedades taninosas e de 10,1 a 16,7% em frutos de variedades doces, superando, nesse quesito, o da maioria das frutas de consumo popular (BENATO; SIGRIST; ROCHA, 2006; CORSATO, 2004).

O caqui é fonte de Cálcio, Fósforo e Sódio, concentra elevada quantidade de vitamina A. Contém também vitaminas hidrossolúveis, B1, B2 e vitamina C (CORSATO, 2004).

Sendo o caqui um fruto que, de modo geral, não é submetido a tratamentos fitossanitários em pós-colheita, os microrganismos que, de algum modo, contaminarem o fruto, ali permanecerão até o final da cadeia, com potencial de multiplicação de acordo com fatores ambientais e com o processo de amadurecimento e senescência do fruto.

## **2.2 *Salmonella* spp. – características, importância.**

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, intracelulares facultativos, predominantemente móveis devido à presença de flagelos peritríquios, com exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* que são imóveis (CASTRO, 2000; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; VISSONI, 2003).

Possuem a capacidade de reduzir nitrato a nitrito, fermentam a glicose produzindo gás, mas não lactose e sacarose, produzem sulfeto de hidrogênio em Agar Tríplice Açúcar-Ferro (TSIA). São oxidase negativa, catalase e lisina descarboxilase positiva, não hidrolisam a uréia, utilizam citrato como a única fonte de carbono na presença de uma fonte inorgânica de nitrogênio (CASTRO, 2000; VISSONI, 2003).

O pH ótimo para a multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. As salmonelas não toleram concentrações de sal superiores a 9%. (FRANCO; LANDGRAF, 2003)

A temperatura ideal para a multiplicação de *Salmonella* é 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima 47°C (FRANCO; LANDGRAF, 2003; VISSONI, 2003).

Com relação à atividade de água ( $A_w$ ), a inibição do crescimento tem sido relatada por valores de  $A_w$  inferiores a 0,94 em meio com pH neutro (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

O gênero *Salmonella* é dividido em tipos sorológicos (sorotipagem) segundo o esquema de Kauffmann & White, tendo por base a composição antigênica das salmonelas com relação aos seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar). O antígeno O localiza-se na fração lipopolissacarídica (LPS) da membrana externa. Essa fração é constituída de um lipídio, denominado lipídio A, responsável pelo efeito tóxico (endotoxina). Os antígenos H são de natureza protéica. Os antígenos O e Vi são termorresistentes, não sendo destruídos pelo aquecimento a 100°C por 2 horas e os antígenos H são termolábeis (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Os antígenos somáticos são representados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos, os antígenos flagelares são representados por letras minúsculas do alfabeto e por números arábicos, podendo ocorrer em uma fase (monofásica) ou duas fases (bifásicas), ou mesmo não possuir antígeno flagelar H (CASTRO, 2000; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

O esquema de classificação mais recente propõe a divisão do gênero em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a primeira constituída por seis subespécies (*S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae*, *S. enterica* subsp. *indica*). Os organismos pertencentes ao grupo V foram elevados a espécie como *S. bongori*. Essas mudanças se basearam na hibridização do DNA e nas caracterizações eletroforéticas com enzimas multilocus das salmonelas. Assim, a forma existente a muito tempo de tratar sorovares de *Salmonella* como espécies não é mais válida. Por exemplo, *S. typhimurium* deve ser referenciada como *S. enterica* sorovar Typhimurium ou *Salmonella* Typhimurium, com a primeira letra maiúscula e sem itálico. A maioria dos sorotipos responsáveis por causar enfermidades no homem e nos animais está contida na espécie *enterica*, subsp. *enterica*. Existem, atualmente, 2400 sorotipos de *Salmonella*, dos quais 2000 pertencem a esta subespécie (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

As salmonelas são responsáveis por três grandes síndromes:

- a) Febre Tifóide: tem como agente etiológico o sorotipo *Salmonella* Typhi, e só acomete o ser humano, sendo este o único reservatório da bactéria. A doença normalmente é transmitida por água e alimentos contaminados com material fecal humano. Os sintomas são muito graves e incluem septicemia, febre alta (entre 39 e 40°C), diarreia, vômitos, letargia, dores abdominais, cefaléia, perda de apetite e erupções cutâneas achatadas, com duração de uma a oito semanas e taxa de letalidade de 10%. O período de incubação é em torno de 15 dias. Algumas pessoas podem se tornar portadoras durante meses, mesmo após o desaparecimento dos sintomas, tornando-se importantes fontes de infecção, uma vez que continuam a excretar o microrganismo nas fezes (EDUARDO et al, 2007; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005);
- b) Febre Paratifóide: tem como agentes etiológicos os sorotipos *Salmonella* Paratyphi A e C, que causam doença semelhante à febre tifóide, mas com sintomas mais brandos. Geralmente ocorre septicemia, febre, vômitos e diarreia, com duração máxima de três semanas. Também só acomete os seres humanos, sendo igualmente transmitida pelo consumo de água e alimentos contaminados (GERMANO; GERMANO, 2003; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005);
- c) Salmoneloses ou Enterocolites: causadas pelos demais sorotipos, com exceção dos espécie-específicos; caracterizam-se por um quadro clínico que inclui, febre, diarreia, dores abdominais, náuseas, vômitos, calafrios e cefaléia. O período de incubação é de 12 a 36 horas e a doença, normalmente dura de 4 a 5 dias. De um modo geral, as enterocolites por *Salmonella* são autolimitantes, não necessitando de tratamento com antibióticos, embora para determinados grupos de risco, tais como crianças, idosos e imunodeprimidos, a enfermidade possa vir a se agravar, já que as salmonelas podem vir a atingir a corrente sanguínea e provocar infecção e lesões em outros órgãos. Durante o período da doença, a pessoa infectada excreta grande quantidade de *Salmonella* pelas fezes, quantidade esta que diminui com o tempo. Em alguns casos, entretanto, a excreção do

microrganismo pode persistir por até três meses (FRANCO; LANDGRAF, 2003; GERMANO; GERMANO, 2003; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; VISSONI, 2003). As salmonelas atravessam a camada epitelial intestinal, penetram no lúmen intestinal, onde se proliferam provocando inflamações que irão depender da intensidade da proliferação bacteriana e da liberação de endotoxinas pela morte celular, causando enterocolite e perda de fluido intestinal (FRANCO; LANDGRAF, 2003; VISSONI, 2003).

A dose infectante capaz de produzir a doença varia com a idade, saúde do hospedeiro e virulência das cepas, não existindo uma dose específica (CASTRO, 2000; VISSONI, 2003). Alguns trabalhos relatam que a dose infectante pode ser de 15-20 células (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA, 1998; KAUFMANN; RAUPACH; FINLAY, 2006), outros consideram  $10^6$  UFC/g ou mais, no entanto existem evidências de que 100 – 1000 células são suficientes para causar doenças em crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas (CASTRO, 2000; POPPE, 1996; VISSONI, 2003).

O habitat primário de *Salmonella* spp. é o trato gastrintestinal dos animais, como os pássaros, répteis, mamíferos domésticos e silvestres, humanos e ocasionalmente insetos. Apesar de o trato gastrintestinal ser o seu reservatório natural, elas podem ser encontradas em outras partes do corpo. Como forma intestinal, são excretadas nas fezes das quais podem ser transmitidas para insetos e outros animais, podendo também ser encontradas na água, principalmente água poluída. Quando água ou alimentos contaminados são ingeridos pelo homem ou outros animais, esses organismos são novamente liberados através do material fecal dando continuidade ao ciclo (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Nos últimos 20 anos é incontestável o aumento da incidência de surtos envolvendo salmonelas, devido a essa bactéria ser o principal agente etiológico de infecção alimentar humana (CASTRO, 2000). Significativo aumento de *Salmonella* Enteritidis foi detectado, no Brasil, a partir de 1993, tornando-se desde 1994 o sorotipo de *Salmonella* mais frequentemente isolado de casos de infecções humanas (EDUARDO et al., 2007).

Produtos frescos de origem vegetal têm sido detectados como veículo de transmissão de surtos envolvendo doenças transmitidas por alimentos (MADDEN,

1992), muitos destes surtos são de origem bacteriana, envolvendo principalmente *Salmonella* spp (Tabela 1). O potencial para a contaminação microbiana de frutas e vegetais é elevado devido à grande variedade de condições de contaminação nas quais o produto é exposto durante o crescimento, colheita e distribuição.

**Tabela 1-** Alguns surtos de doenças de origem alimentar causadas por *Salmonella*

Produtos/Local/ Ano(s)	Número de Casos	Sorotipo de <i>Salmonella</i>
Tomate, 5 Estados -E.U.A., 1990	176	Javiana
Tomate, E.U.A., 1993	100	Montevideo
Tomate, 8 Estados -E.U.A., 1998-1999	85	Baidon
Broto de alfafa, 7 Estados - E.U.A., 1999	157	Muenchen
Broto de alfafa, 4 Estados - E.U.A., 2001	31	Kottbus
Melão, 12 Estados -E.U.A., e Canadá, 2002	47	Poona
Suco de laranja não-pasteurizado, 13 Estados - E.U.A., 2 Províncias Canadenses, 1999	298	Muenchen
Amendoim, Austrália, Canadá, Reino Unido, 2001	102	Stanley

Fonte: JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005.

### 2.3 *Salmonella* Enteritidis

*S. Enteritidis* é freqüentemente encontrada no trato intestinal de animais, domésticos e selvagens, sendo muito comum em aves e ovos. O mecanismo de transmissão é através do consumo de ovos intactos, que portanto, só poderiam ter sido infectados antes da postura, o que só recentemente tornou-se mais claro, permitindo melhor compreensão do problema. A matéria fecal eliminada pelas aves, contendo a bactéria, pode contaminar os ovos externamente. Porém, também foi constatado que a *S. Enteritidis* infecta os ovários de galinhas com aparência saudável, contaminando os ovos antes das cascas serem formadas (transmissão transovariana), o que torna difícil o controle de *S. Enteritidis* pela saúde pública. Quando os ovos são ingeridos, insuficientemente cozidos ou crus (ex. maionese caseira) podem transmitir a infecção,

ocasionando casos isolados ou surtos epidêmicos (EDUARDO et al., 2007; SAEED et al., 1999).

Apesar de estar relacionada com o consumo de carnes e ovos, doenças provocadas por *S. Enteritidis* através do consumo de frutas e vegetais frescos tem aumentado, devido à contaminação pré ou pós-colheita. Esta contaminação provavelmente é ocasionada direta ou indiretamente por material fecal através da utilização de adubos orgânicos, irrigação com água contaminada, condições precárias de higiene no campo e pelos manipuladores de alimentos, limpeza e sanitização inadequada dos equipamentos de processamento (UKUKU, 2005).

#### **2.4 Incidência e surtos relacionados com *Salmonella* spp. em frutas.**

Existem muitos relatos de doenças devido ao consumo de frutas e vegetais que foram contaminados por patógenos entéricos (CDC, 2002b; UKUKU, 2005; UKUKU; SAPERS, 2001). A *Salmonella* vem sendo uma das causas mais comuns de gastroenterites bacterianas notificadas nos Estados Unidos, principalmente relacionadas com melões (CDC, 2002a).

Al-Hindawi e Rished (1979) analisaram 353 amostras de alimentos locais na cidade de Baghdad, Iraque, para *Salmonella*, entre eles azeitonas, vegetais crus (tomates, aipo, alface, salada verde) e frutas (uvas e tâmaras frescas), mostrando níveis de contaminação de 1,4%, 0,85% e 0% de *Salmonella* spp respectivamente.

Em um estudo feito por Blostein (1993), *Salmonella* Javiana foi responsável por um surto associado ao consumo de melancia entre escolares em 1991.

O Food and Drug Administration (FDA) analisou 1.440 melões importados do México no período de Março a Abril de 1990 nos Estados Unidos e os resultados destas análises revelaram que 11 melões (0,76%) apresentavam espécies de *Salmonella* em sua superfície. Um segundo estudo, realizado de 19 de novembro a 3 de Janeiro de 1991, mostrou que 24 (1,06%) de 2.220 melões analisados continham espécies de *Salmonella* (MADDEN, 1992).

Em um levantamento feito pelo FDA em 1999 nos Estados Unidos., com produtos frescos importados da Argentina, Bélgica, Canadá e México, *Salmonella* foi

isolada de uma dentre 143 amostras de morangos (0,7%), oito (5,3%) de 151 amostras de melões analisados e esteve ausente em 20 tomates analisados (FDA, 1999).

Palú et al. (2002), avaliando amostras de hortaliças frescas em restaurantes *self-service* privados da Universidade Federal do Rio de Janeiro, encontraram *Salmonella* em saladas de alface.

Salleh et al. (2005) analisaram 112 amostras de algumas ervas aquáticas comestíveis também conhecidas como espinafres d'água (*Oenanthe stolonifera*, *Ipomoea aquatica*, *Polygonum minus*) e centelha-asiática (*Centella asiatica*) obtidas de três supermercados diferentes em Selangor, Malásia onde detectaram *Salmonella* em 40 (35%) das amostras analisadas. Os principais sorotipos isolados foram *S. Weltevreden* (23,5%), *S. Agona* (16,2%), *S. Senftenberg* (10,1%) e *S. Albany* (6,7%).

Bordini et al. (2007) avaliaram a incidência de *Salmonella* em mangas, var. Tommy Atkins, produzidas no Brasil, sendo 33 amostras destinadas à exportação e 67 amostras destinadas ao mercado interno. Os resultados mostraram a presença de *Salmonella enterica*, subespécie *enterica* sorotipo 3,15,54:–:– e S.I 4,5,12; i:– em duas das 67 amostras destinadas ao mercado interno, sendo que as amostras destinadas à exportação não apresentaram *Salmonella*.

Grande parte dos surtos envolvendo salmonelas está relacionado com melões. O primeiro surto ocorreu nos Estados Unidos em 1990, devido ao consumo de melões importados do México e América Central, 295 casos foram relacionados a *Salmonella* Chester envolvendo 30 Estados (BEUCHAT; SCOUTEN, 2007). No verão de 1991, mais de 400 casos de *Salmonella* Poona nos Estados Unidos e Canadá foram devido ao consumo de melão pré-fatiado originário do Texas e/ou México (CDC, 1991). O surto mais recente envolvendo melões ocorreu de 2000 a 2002 em 13 Estados dos EUA e do Canadá, ocasionando 2 mortes na Califórnia (CDC, 2002a).

Em 1999, surto de *S. Muenchen* ocorreu nos Estados Unidos e Canadá associado a suco de laranja não-pasteurizado de um único distribuidor, comercialmente distribuído em hotéis, restaurantes, supermercados de vários Estados dos EUA e províncias do Canadá (CDC, 1999).

Durante o verão de 2004, três surtos envolvendo *Salmonella* foram associados com o consumo de tomates Roma nos EUA e Canadá. Em um dos surtos ocorridos nos



EUA vários sorotipos de *Salmonella* foram encontrados (*S. Javiana*, *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Thompson* e *S. Muenchen*), todos associados com tomates Roma expostos em vários locais de uma rede de delicatessen. Cada um dos outros surtos foram caracterizados por apenas um único sorotipo de *Salmonella*: *S. Braenderup*, em 16 Estados dos EUA e *S. Javiana* no Canadá. Durante os três surtos 561 casos foram relatados em 18 Estados dos EUA e uma Província do Canadá (CDC, 2005).

Entre dezembro de 1998 e março de 1999 foram relatados 86 casos de salmoneloses associadas com o consumo de tomates crus preparados em restaurantes entre oito Estados dos EUA, provocadas por um sorotipo raro de *Salmonella* (*S. Baildon*) (CDC, 2001).

Em dezembro de 1999, nos Estados Unidos um surto envolvendo *Salmonella* Newport esteve associado ao consumo de mangas frescas importadas do Brasil. Ocorreram 78 casos e 2 mortes em 13 Estados norte-americanos (SIVAPALASINGAM et al., 2006).

Em 2000 ocorreu um surto de *Salmonella* Enteritidis nos Países Baixos - Holanda, associado com o consumo de brotos de feijão (CDC, 2002b).

## **2.5 Crescimento e multiplicação de *Salmonella* spp. em frutas**

Asplund e Nurmi (1991) relataram o crescimento de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Infantis e *Salmonella* Typhimurium em tomates armazenados em temperatura ambiente de 22 e 30°C, com pH entre 3,99 e 4,37.

Golden et al. (1993) relataram a habilidade de *Salmonella* spp crescer no interior dos tecidos de melancia e melão a 23°C. As frutas foram inoculadas com uma mistura contendo parcelas iguais de 5 espécies de *Salmonella* (*S. Anatum*, *S. Chester*, *S. Havana*, *S. Poona* e *S. Senftenberg*).

Monge et al. (1995) avaliaram a qualidade sanitária de frutas comercializadas na rua durante o período de março de 1990 a março de 1993 em San José, Costa Rica. Dentre outros microrganismos eles pesquisaram a presença de *Salmonella* spp em sucos de frutas naturais, salada de frutas e frutas, normalmente comercializadas já fatiadas nas ruas (como abacaxi, mamão, manga verde e melancia) e aquelas que

poderiam ser consumidas sem descascar como muricis e cajás. Foram analisadas 50 amostras de cada fruta, 50 refrescos naturais e 50 saladas de frutas. *Salmonella* spp. não foi isolada de nenhuma das amostras analisadas.

Zhuang, Beuchat e Angulo (1995) verificaram a habilidade de crescimento de *Salmonella* Montevideo na superfície e no interior dos tecidos de tomates, indicando que a *Salmonella* cresce bem na superfície e no interior dos tomates a temperatura ambiente.

Parish, Narciso e Friedrich (1997) estudaram a sobrevivência de salmonelas em suco de laranja. *Salmonella* Gaminara, S. Hartford, S. Rubislaw e S. Typhimurium foram inoculadas em suco de laranja pasteurizado com o pH do suco ajustado para 3,5; 3,8; 4,1 e 4,4 e incubado a 0 e 4°C. As salmonelas inoculadas apresentaram sobrevivência de 27 dias a pH 3,5, 46 dias em pH 3,8, 60 dias em pH 4,1 e 73 dias em pH 4,4.

Em 1999 Roering et al. compararam a sobrevivência de três misturas (com  $10^7$  UFC/ml cada) de S. Typhimurium DT104, *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 em sidra de maçã pasteurizada e não pasteurizada sem conservante (pH 3.5), armazenadas a 4 e 10°C por 21 dias. A população de S. Typhimurium diminuiu durante 14 dias de armazenamento a 4 e a 10°C nos dois tipos de sidra.

Liao e Sapers (2000) relataram o crescimento de *Salmonella* Chester em rodela de maçã (pH 4,1) a 8 e 20°C. Os resultados mostraram que *Salmonella* Chester não cresceu sobre os discos de maçã a 8°C, mas cresceu bem nos discos a 20°C.

Leverentz et al. (2001) verificaram que *Salmonella* Enteritidis pode sobreviver em melões frescos cortados e armazenados a 5°C, e que a população aumentou em 2 log a 10°C e 5 log a 20°C durante um período de armazenamento de 168 h.

Um estudo para avaliar o comportamento de *Salmonella* spp. em polpa de abacate foi realizado por Medrano et al. (2001). Eles verificaram que a *Salmonella* apresentou um tempo de geração de 54 e 61 minutos para baixa e alta concentração do inóculo, respectivamente a 22°C. Uma população de 6,34 log UFC/g foi alcançada depois de 18 horas de incubação. Nenhum crescimento do patógeno foi observado a temperatura de refrigeração (4-7°C).

Penteado e Leitão (2003) investigaram a habilidade de crescimento de *Salmonella* Enteritidis em polpas de melão, melancia e mamão armazenados sob

diferentes tempos e temperaturas. Os resultados mostraram que *Salmonella* Enteritidis pode crescer em polpa de fruta de baixa acidez e que a refrigeração a 10°C, embora reduza a geração média, não inibe seu crescimento.

Ukuku e Sapers (2007) investigaram o efeito do tempo antes do armazenamento e a temperatura de armazenamento na sobrevivência de *Salmonella* inoculada em melancia e em dois tipos diferentes de melões, “cantaloupe” e “honeydew” minimamente processados, onde inocularam uma mistura de *Salmonella* Newport, *Salmonella* Poona, *Salmonella* Hidalgo, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* St. Paul. Os resultados mostraram que a população de *Salmonella* apresentou um leve declínio quando as frutas foram armazenadas por 12 dias a 5°C, mas aumentou durante o armazenamento das frutas a 10°C. Eles observaram também que quando os pedaços das frutas ficaram a 22°C por 3 horas ou mais antes da refrigeração aumentam as chances de proliferação da *Salmonella*.

Bordini et al. (2007) além de avaliarem a incidência de *Salmonella* em mangas, também avaliaram o comportamento deste patógeno nas mangas armazenadas a 8 e 22°C durante 24 e 144 horas. Os resultados mostraram que *Salmonella* se multiplicou muito bem na fruta armazenada a 22°C, entretanto, seu crescimento foi menor na fruta armazenada a 8°C.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Incidência de *Salmonella* spp. na superfície de caqui.

##### 3.1.1 Amostras

Foram coletadas 294 amostras de caquis da variedade Rama Forte (tipo variável) e 288 amostras de caquis da variedade Fuyu (tipo doce) no varejo na região de Campinas/SP e no atacado (CEAGESP) em São Paulo para pesquisa de *Salmonella* spp. As coletas foram realizadas no período de abril a junho nas safras de 2005/2006.

##### 3.1.2 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A detecção de *Salmonella* spp. foi feita utilizando-se o sistema BAX® (Figura 1) da Dupont/Qualicon, o qual se baseia na reação de polimerase em cadeia (PCR), seguindo-se a orientação do fabricante. Segundo o fabricante, o BAX® apresenta sensibilidade maior ou igual a 98%, especificidade maior ou igual a 98%, taxa de falsos negativos menor ou igual a 2% (USER'S GUIDE, 2000).

As análises de *Salmonella* na superfície das amostras de caqui, assim como a metodologia requerida para o uso do sistema BAX® foram realizadas de acordo com o esquema apresentado na Figura 2.

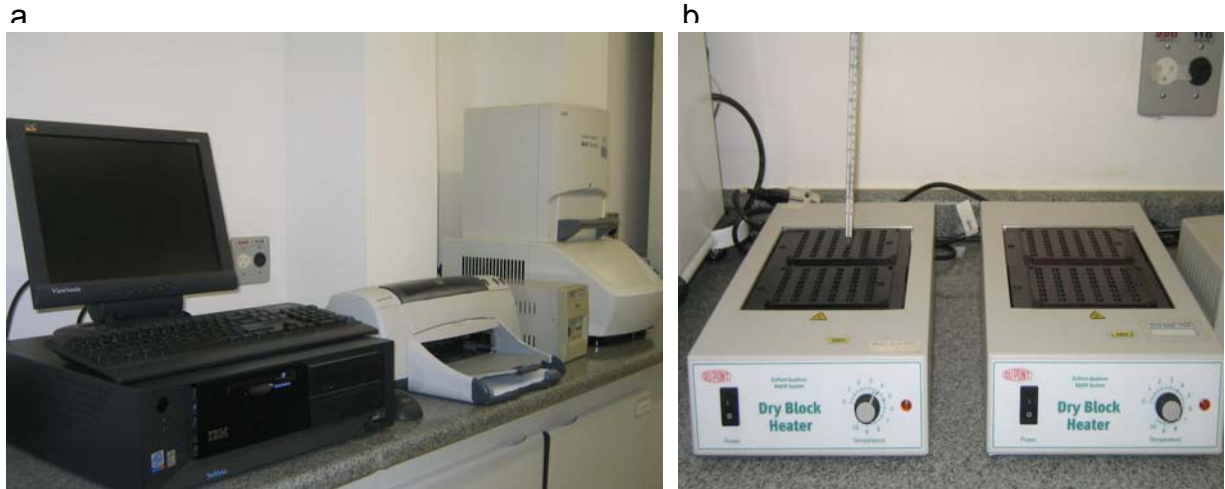
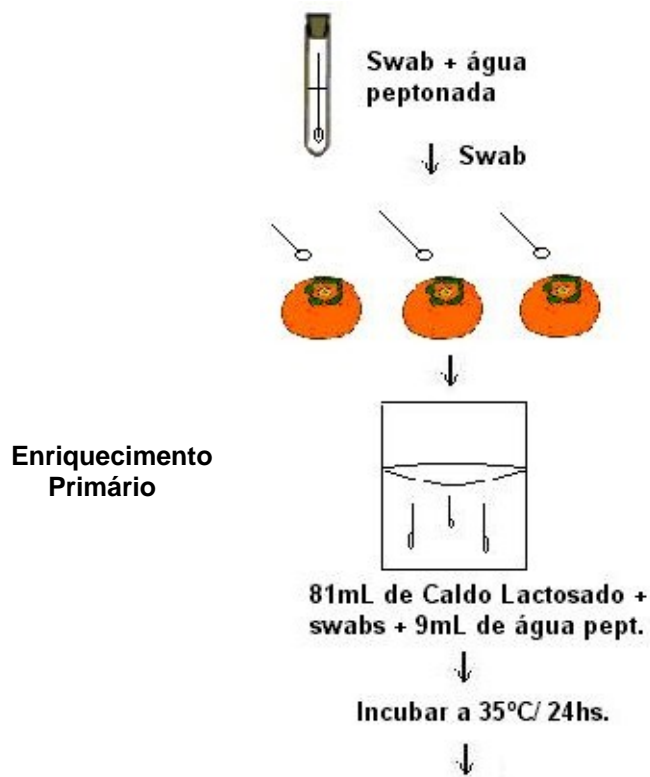
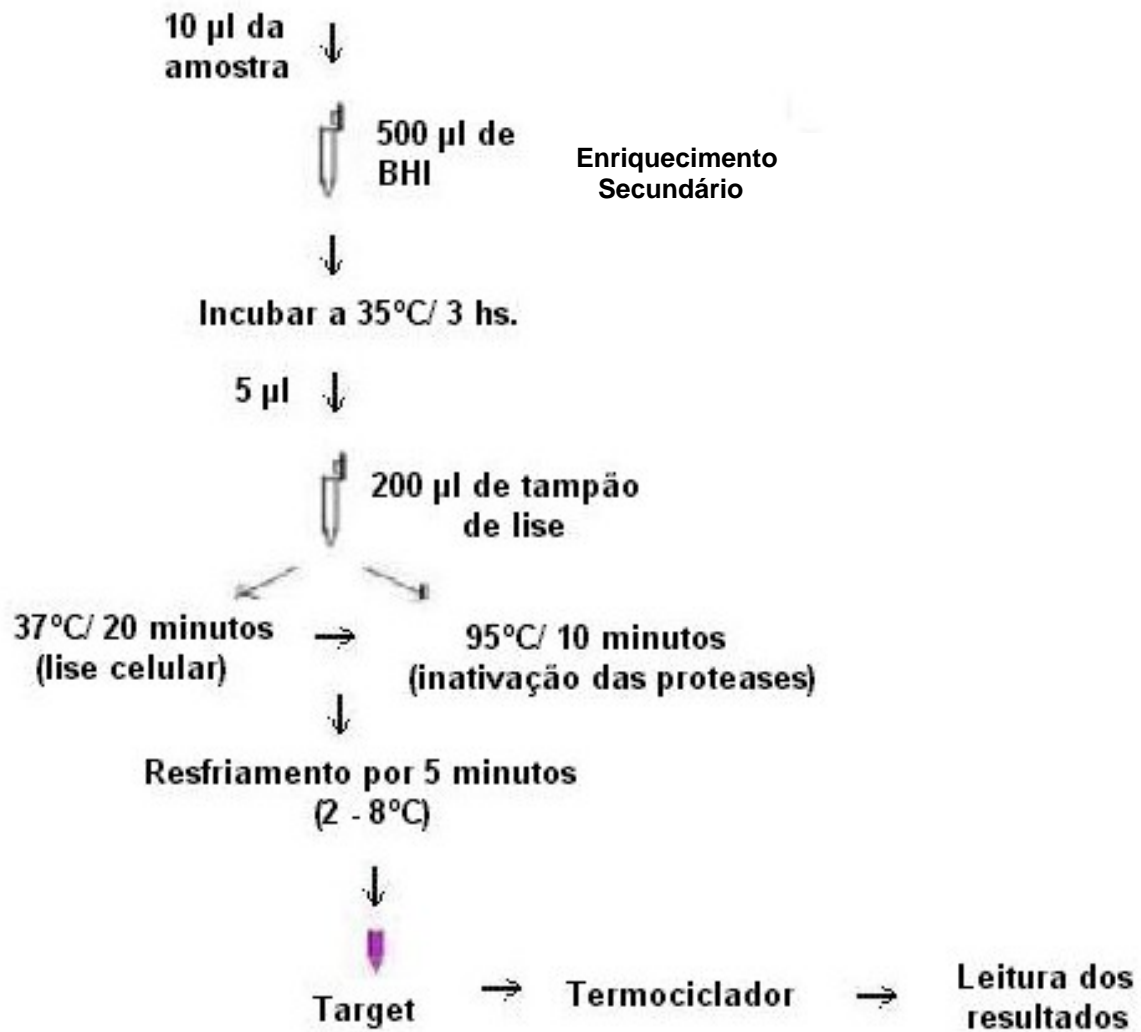


Figura 1 – O sistema Bax®. a - O equipamento. b – “Banhos” onde ocorrem a lise celular e a inativação da protease



(continua)

Figura 2 – Etapas da metodologia requerida para uso do BAX® para as análises de *Salmonella* spp na superfície de caqui



(conclusão)

**Figura 2** – Etapas da metodologia requerida para uso do BAX® para as análises de *Salmonella* spp na superfície de caqui

### 3.1.3 Confirmação de *Salmonella* spp.

Foram realizados alguns testes bioquímicos para confirmação das salmonelas encontradas na superfície dos caquis. Os testes realizados foram: teste da oxidase, teste da urease, teste do indol, reação em Agar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e em Agar Lisina Ferro (LIA), teste sorológico somático polivalente (SILVEIRA; JUNQUEIRA;

SILVA, 2001). Além destes, foi utilizado o *Kit Api-Salmonella*, o qual consiste em uma galeria com 10 provas bioquímicas e, ainda, coloração de Gram.

## **3.2 Curvas de Crescimento**

### **3.2.1 Atividade de água (Aw) da casca e da polpa do caqui**

A atividade de água da polpa e da casca foi monitorada durante o período de armazenamento à 10°C utilizando o aparelho Aqualab® (Decagon).

### **3.2.2 Frutas**

Para a realização das curvas de crescimento foram utilizadas amostras de caquis das variedades 'Rama Forte' e 'Fuyu', obtidos do mercado atacadista e varejista, na região de Campinas, SP.

### **3.2.3 Cultura Bacteriana**

A cultura bacteriana de *Salmonella* Enteritidis (3065/89-2) utilizada neste estudo foi proveniente do acervo de culturas do Laboratório de Higiene da Faculdade de Engenharia de Alimentos, da UNICAMP. A cultura foi mantida em Ágar Trypticase de Soja (TSA; Oxoid, Oxoid Ltd. Basingstoke, Hampshire, England) inclinado a 7°C. Foram feitos testes bioquímicos e sorológicos para a confirmação da cepa conforme descrito por Silva, Junqueira e Silveira (2001).

### **3.2.4 Preparo do Inóculo**

O microrganismo foi cultivado em tubos com TSA inclinados a 35°C. O inóculo foi transferido para TSA inclinado três vezes consecutivas em intervalos de 24 horas imediatamente antes de serem usados para o experimento. As células foram coletadas do TSA e transferidas para 5mL de solução salina (NaCl 0,85%) até que a suspensão alcançasse uma concentração de  $2 \times 10^8$ /mL de acordo com a escala de turbidez de MacFarland e usando o equipamento Densimat (bioMerieux). Em seguida, a suspensão bacteriana foi diluída em série (1:10) em 9mL de água peptonada 0,1%, até atingir uma diluição com concentração de  $10^4$  UFC/mL, a qual foi utilizada para inoculação das frutas.

### **3.2.5 Preparo das Amostras da Polpa e da Casca**

As frutas foram lavadas primeiramente em água corrente com uma esponja limpa contendo detergente neutro até a retirada de toda a sujeira da superfície. Em seguida, elas foram imersas em um recipiente contendo solução de hipoclorito de sódio a 150 mg.L por 15 minutos. Após o tempo determinado, as frutas foram retiradas da solução e colocadas para secar dentro de uma câmara asséptica de fluxo contínuo para patógenos (Pachane – PA 100). A casca e a polpa dos caquis foram retiradas assepticamente com estilete e espátulas estéreis, e em seguida, foram colocadas em bolsas estéreis e armazenadas sob refrigeração até o início do experimento (PENTEADO; LEITÃO, 2003).

A verificação da esterilidade das cascas e da polpa foi realizada retirando-se 1g de cada bolsa estéril contendo as amostras, a qual foi adicionada em 9mL do diluente (água peptonada) na proporção 1:10, plaqueada em PCA (plaqueamento em profundidade) e incubada a 35°C por 48 horas. As bolsas que continham amostras que apresentaram algum tipo de contaminação foram descartadas.



Após esse procedimento e antes da inoculação foram retiradas assepticamente porções de 2g de casca e colocadas em placas de Petri estéreis para a realização do experimento.

A polpa estéril dos caquis foi congelada até o momento do experimento das curvas de crescimento, quando foram retiradas do freezer para descongelamento. Após terem atingido temperatura ambiente, foram retiradas assepticamente porções de 1g e colocadas em tubos de ensaio estéreis com rosca.

### **3.2.6 Inoculação da polpa e da casca com *Salmonella* Enteritidis**

Porções (1g) em duplicata de polpa colocadas em tubos de ensaio estéreis foram inoculadas com 10 $\mu$ l da suspensão contendo 10<sup>4</sup> UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis e incubadas pelos seguintes tempos em cada temperatura:

- 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 horas a 10°C;
- 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 24, 36, 42 e 48 horas a 20°C;
- 0, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 24 e 26 horas a 30°C.

Em cada tempo, foram adicionados 9mL de água peptonada estéril nas amostras e diluídas em série (1:10), de cada diluição foi retirado 0,1ml e colocado em placas contendo TSA e espalhadas com alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e em seguida submetidas a contagem das colônias, com a ajuda de um contador de colônias, sendo os resultados expressos em UFC/g.

O mesmo procedimento foi utilizado para as porções de 2g de casca.

### **3.2.7 Parâmetros de crescimento**

Os parâmetros de crescimento para comparação do crescimento de *S. Enteritidis* na casca e na polpa das duas variedades de caqui estudadas foram obtidos através do tempo de geração (TG) e da taxa de crescimento exponencial (T.C.E).

### **3.2.7.1 Tempo de geração (TG)**

O tempo de geração (TG) foi calculado a partir da inclinação da reta obtida na faixa de crescimento exponencial. A seguinte equação foi utilizada  $TG = 0.301/\text{inclinação}$  como descrito por MADIGAN *et al.* (1997).

### **3.2.7.2 Taxa de crescimento exponencial (T.C.E.)**

O valor da taxa de crescimento exponencial foi a inclinação da reta utilizada no cálculo do tempo de geração como descrito no item anterior.

#### **4 ANÁLISE DOS RESULTADOS**

Os dados foram compilados em planilhas do programa Excel (Microsoft, Redmond, WA), os parâmetros de crescimento obtidos foram comparados utilizando o procedimento de comparação pareada de Tukey.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Pesquisa de *Salmonella* spp

A pesquisa realizada para *Salmonella* spp revelou a presença deste patógeno em 5 das 141 amostras compostas (582 frutos) analisadas (incidência de 0,9%), sendo duas (2) amostras da variedade Rama Forte coletados no varejo, duas (2) amostras da variedade Fuyu procedentes do CEAGESP e uma (1) coletada no varejo (Tabela 2).

**Tabela 2** – Incidência de *Salmonella* spp na casca de frutos de caqui, ‘Fuyu’ e ‘Rama Forte’, coletados no atacado e no varejo, durante os meses de abril a maio, nas safras de 2005 e 2006

Variedades de caqui	Atacado			Varejo			total		
	n. de amostras	n	%	n. de amostras	n	%	n. de amostras	n	%
“Fuyu”	134	2	1,5	154	1	0,7	288	3	1,04
“Rama Forte”	134	0	0	160	2	1,25	294	2	0,7
Total	268	2	0,7	314	3	0,9	582	5	0,9

As salmonelas encontradas nas amostras foram confirmadas através de testes bioquímicos.

Não existem dados na literatura sobre a incidência de *Salmonella* spp em caqui e, de modo geral, também são poucos os dados relativos a incidência desse patógeno em frutas. Dados semelhantes foram relatados pelo “Food and Drug Administration” (FDA) analisou 1440 melões importados de 26 de março a 13 de abril de 1990 e verificaram que somente 11 melões (0,76% daqueles amostrados) apresentavam contaminação por *Salmonella* na superfície. Outra pesquisa realizada de 19 de novembro a 3 de janeiro de 1991 mostrou que 24 dos 2200 (1,06%) melões analisados foram positivos para *Salmonella* (MADDEN, 1992).

Em um levantamento realizado em 1999 pelo FDA em produtos frescos importados, *Salmonella* foi isolada de 1 em 143 amostras de morango analisadas

(0,7%), de oito dentre 151 amostras de melão (5,3%) e estava ausente em 20 amostras de tomate (FDA, 1999).

Por outro lado, os resultados obtidos neste estudo são ligeiramente inferiores aos obtidos por alguns pesquisadores. Num estudo recente, Bordini et al. (2007) avaliaram a incidência de *Salmonella* em mangas, var. Tommy Atkins, produzidas no Brasil, sendo 33 amostras destinadas à exportação e 67 amostras destinadas ao mercado interno. Os resultados mostraram a presença de *Salmonella enterica*, subespécie *enterica* em duas das 67 amostras destinadas ao mercado interno, sendo que as amostras destinadas à exportação não apresentaram *Salmonella*.

Viswanathan e Kaur (2001) detectaram *Salmonella* spp em 37,5% das amostras de frutas coletadas de vendedores de rua em Mumbai (Índia) em 2001. Esses resultados indicam que pode haver elevada ocorrência de *Salmonella* spp em frutas, em determinadas situações.

Resultados com contaminações inferiores a este estudo também foram encontrados por alguns pesquisadores. Monge et al. (1995) avaliaram a qualidade sanitária de frutas comercializadas na rua durante o período de março de 1990 a março de 1993 em San José, Costa Rica. Dentre outros microrganismos eles pesquisaram a presença de *Salmonella* spp em sucos de frutas naturais, salada de frutas e frutas, normalmente comercializadas já fatiadas nas ruas (como abacaxi, mamão, manga verde e melancia) e aquelas que poderiam ser consumidas sem descascar como muricis e cajás. Foram analisadas 50 amostras de cada fruta, 50 refrescos naturais e 50 saladas de frutas. *Salmonella* spp. não foi isolada de nenhuma das amostras analisadas.

Parish (1998) não detectou *Salmonella* spp. nas 375 amostras de superfície de frutos de laranja e sucos analisados nos E.U.A.

Penteado e Leitão (2003) verificaram a incidência de *Salmonella* spp e *Listeria* spp. na superfície de melões, melancias e mamões frescos (20 amostras/cada), coletados no atacado (60 amostras) e varejo (60 amostras) em Campinas, S.P., Brasil. *Salmonella* spp não foi detectada em nenhuma das 120 amostras analisadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as condições sanitárias durante o cultivo (água de irrigação, adubo, etc.), colheita, transporte e armazenamento,

assim como a manipulação das frutas pode levar à contaminação por *Salmonella*. Embora *Salmonella* tenha sido encontrada em pequena quantidade, essas frutas podem oferecer risco ao consumidor, pois dependendo do número de células do patógeno presentes, da idade e do sistema imunológico do consumidor, a ingestão dessas frutas podem provocar desde uma simples gastroenterite a sérios problemas, podendo ocasionar a morte.

## 5.2 Avaliação da Atividade de Água (Aw) da casca e da polpa.

### a) Aw Casca

De acordo com a tabela 3, não houve alteração significativa da Aw da casca entre o primeiro e o décimo dia de armazenamento, o que não interferiu no crescimento da *S. Enteritidis* na casca armazenada a 10°C. A diferença observada na Aw das variedades Fuyu e Rama Forte entre o primeiro e o décimo dia de armazenamento foi de 0,009, levando em consideração a Aw ótima (0,94 e 0,99) para *Salmonella*, essa alteração não pode ter afetado o seu crescimento.

**Tabela 3** – Avaliação da Atividade de água (Aw) da casca dos caquis armazenados a 10°C durante 10 dias

<b>Variedade</b>	<b>1º Dia</b>	<b>2º Dia</b>	<b>3º Dia</b>	<b>4ºDia</b>	<b>5ºDia</b>	<b>10ºDia</b>
<b>Fuyu</b>	<b>0,977</b>	0,977	0,977	0,976	0,974	<b>0,968</b>
<b>Rama Forte</b>	<b>0,972</b>	0,972	0,971	0,971	0,971	<b>0,963</b>

### b) Aw polpa

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos para a verificação da Aw da polpa armazenada a 10°C.

**Tabela 4** – Avaliação da Atividade de água ( $A_w$ ) da polpa dos caquis armazenados a 10°C durante 10 dias

<b>Variedade</b>	<b>1º Dia</b>	<b>10º Dia</b>
<b>Fuyu</b>	0,981	0,978
<b>Rama Forte</b>	0,991	0,989

A diferença observada na  $A_w$  da variedade Fuyu entre o primeiro e o décimo dia foi de 0,003, enquanto que a diferença observada para a variedade Rama Forte foi de 0,002. Assim, as diferenças verificadas não podem ter interferido no crescimento de *S. Enteritidis*.

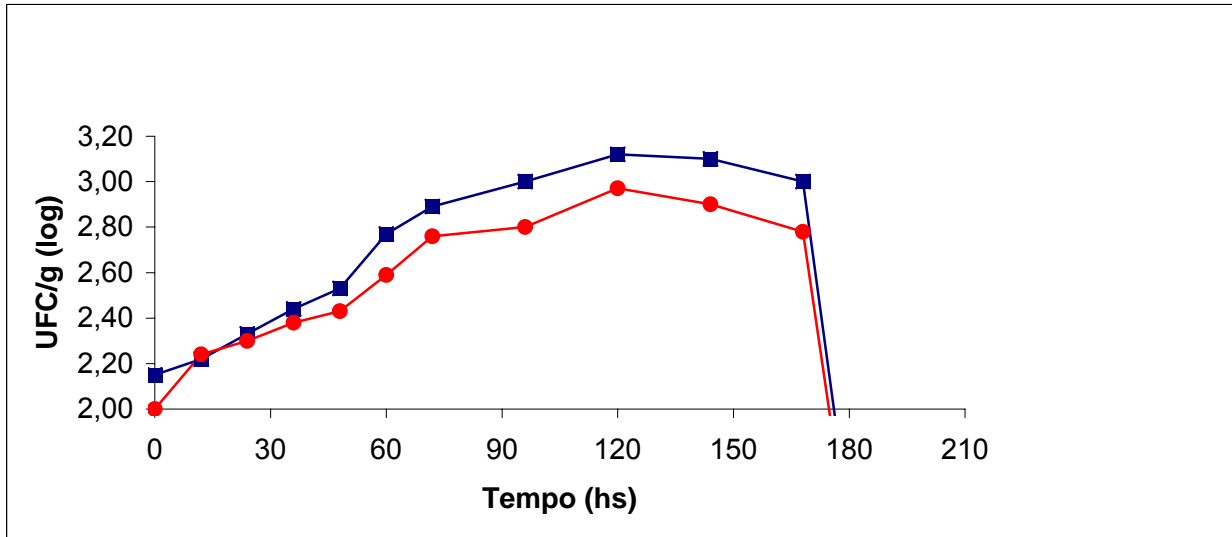
### **5.3 Polpa e casca como substrato para crescimento de *S. Enteritidis***

O pH das variedades de caqui estudadas, determinado previamente por Muñoz (2002), foi de 6,3 e 5,5, respectivamente para 'Fuyu' e 'Rama Forte'. O monitoramento da atividade de água durante o experimento indicou que não houve variações significativas nesse fator. Portanto, nenhum desses fatores se constitui em uma barreira ao crescimento de *Salmonella* Enteritidis.

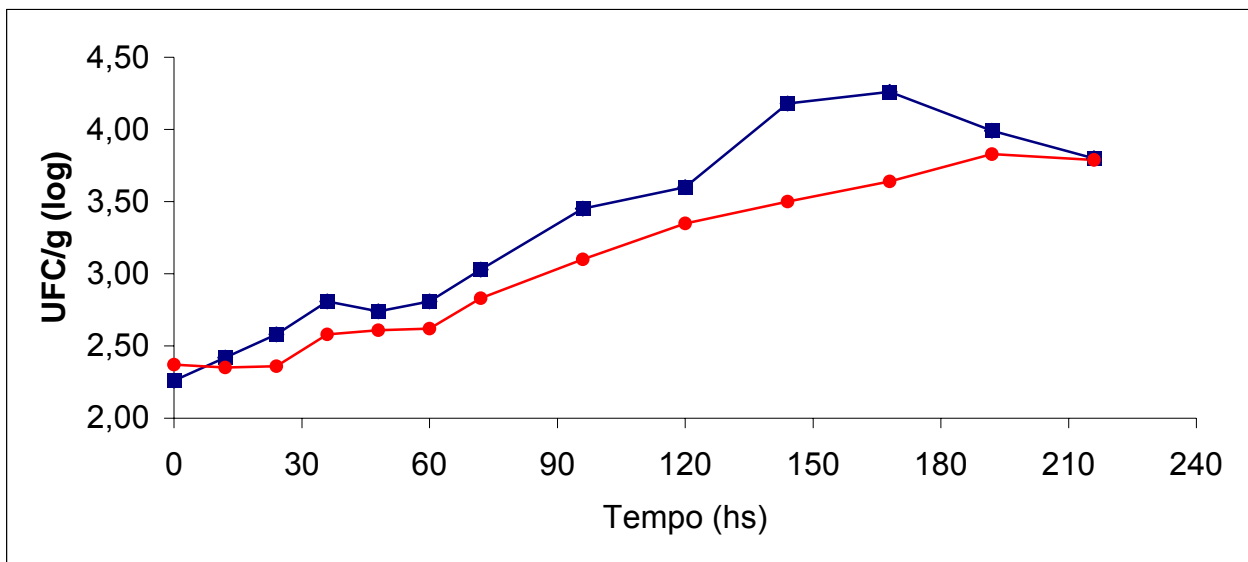
Os procedimentos aplicados para esterilização superficial da casca e remoção asséptica da polpa foram adequados. Todas as análises das amostras não inoculadas realizadas inicialmente e durante o período de incubação revelaram a ausência de *Salmonella* ou de alguma microbiota endógena nos tecidos internos e na casca da fruta.

#### **5.3.1 Crescimento de *S. Enteritidis* a 10°C**

Os resultados apresentados nas Figuras 3 e 4 mostram o comportamento de *S. Enteritidis* na casca e na polpa como substratos das duas variedades de caqui estudadas, incubadas a 10°C.



**Figura 3** - Crescimento de *Salmonella* Enteritidis (log UFC/g) na casca de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 10°C. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (■ Fuyu, ● Rama Forte)



**Figura 4** - Crescimento de *Salmonella* Enteritidis (log UFC/g) na polpa de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 10°C. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (■ Fuyu, ● Rama Forte)

A 10°C, na casca (Figura 3), não se verificou uma fase lag definida de *S. Enteritidis* na variedade Fuyu, no entanto, na variedade Rama Forte, observou-se um intervalo de 24 horas, antes que um crescimento mais intenso fosse observado. Já para



a polpa, nessa mesma temperatura (Figura 4), uma fase lag de cerca de 72 horas pode ser observada, nas duas variedades estudadas. Na casca, houve um aumento máximo, em média de 1,8 e 1,6 ciclos log, após 48 horas, atingindo populações máximas de 3,94 e 3,6 log UFC/g para as variedades Fuyu e Rama Forte, respectivamente. Na polpa, para essa mesma temperatura, observou-se que houve um aumento máximo na população de *Salmonella* Enteritidis, de 2,0 e 1,5 ciclos log, após 168 e 192 horas de incubação, atingindo populações máximas de 4,26 e 3,83 log UFC/g, respectivamente, para as variedades Fuyu (pH 6,3) e Rama Forte (pH 5,5).

Verificou-se que *Salmonella* Enteritidis tem condições de crescer tanto na polpa quanto na casca, mesmo sob baixa temperatura. De um modo geral, tanto na casca quanto na polpa, verificou-se que na variedade Fuyu maiores populações foram atingidas em relação a Rama Forte, essa diferença pode estar relacionada a diferença de pH entre as duas variedades.

Esses resultados mostraram, que temperaturas mais baixas podem retardar o crescimento de *Salmonella* spp., porém não são suficientes para inibir seu crescimento. A temperatura de 10°C está relacionada a temperatura de abuso de geladeira, porém para manter a fruta refrigerada, o ideal seria em torno de 7°C, assim, o crescimento do microrganismo poderia ser ainda mais retardado ou quem sabe até inibido.

### **5.3.2 Crescimento de *S. Enteritidis* a 20°C**

Os resultados apresentados nas Figuras 5 e 6 confirmam a adequação da casca e da polpa das duas variedades de caqui estudadas, como substratos ao crescimento de *S. Enteritidis* incubadas a 20°C.

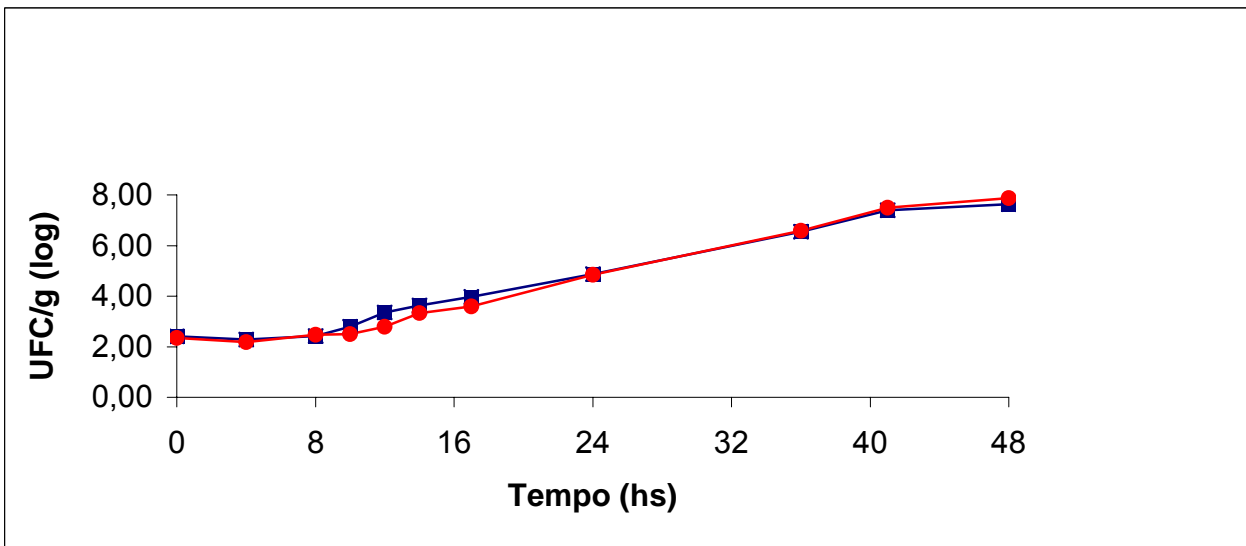


Figura 5 - Crescimento de *Salmonella* Enteritidis (log UFC/g) na casca de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 20°C. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (■ Fuyu, ● Rama Forte)

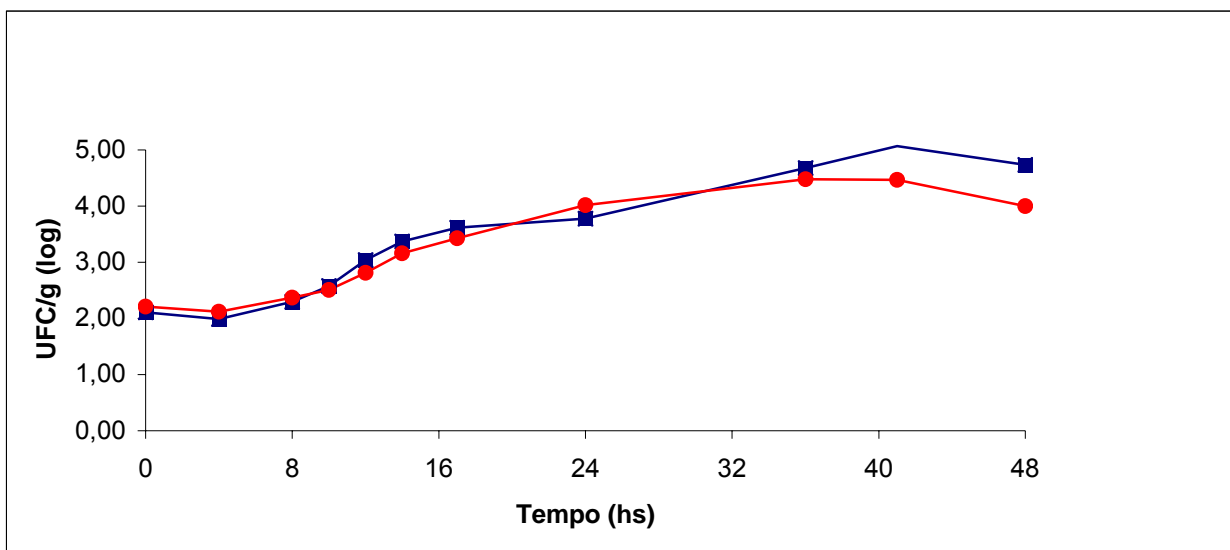


Figura 6 - Crescimento de *Salmonella* Enteritidis (log UFC/g) na polpa de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' à 20°C. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (■ Fuyu, ● Rama Forte)

A 20°C, na casca (Figura 5), verificou-se uma fase lag de cerca de 8 e 10 horas pode ser observada para *S. Enteritidis*, tanto para a variedade Fuyu, quanto para Rama

Forte. Já para a polpa (Figura 6), verificou-se um período de aproximadamente 8 horas (fase lag), para as variedades estudadas, antes que um período mais intenso fosse observado. Na casca, verificou-se um aumento máximo, de 3,0 e 2,3 ciclos log, após aproximadamente 41 horas, respectivamente para Fuyu e Rama Forte, atingindo populações máximas em torno de 5,08 e 4,5 log UFC/g, para as variedades Fuyu e Rama Forte, respectivamente. Na polpa, para essa mesma temperatura, observou-se que houve um aumento máximo na população de *S. Enteritidis*, de aproximadamente 5,2 e de 5,5 ciclos log, após 48 horas de incubação, atingindo populações máximas de 7,64 e 6,6 log UFC/g, respectivamente para Fuyu e Rama Forte.

Verificou-se que *S. Enteritidis* tem condições de crescer tanto na polpa quanto na casca, a 20°C. Isso indica que *Salmonella* spp. consegue crescer no caqui se este for acondicionado em temperatura ambiente, mesmo em dias mais frios. Portanto, o mais adequado manter a fruta sob refrigeração, por mais que não seja garantia de que o crescimento do patógeno seja inibido, pelo menos ela retarda o seu crescimento, aumentando a segurança do alimento.

### **5.3.3 Crescimento de *S. Enteritidis* a 30°C**

Os resultados apresentados nas Figuras 7 e 8 confirmam a adequação da casca e da polpa das duas variedades de caqui estudadas, como substratos ao crescimento de *S. Enteritidis* incubadas a 30°C.

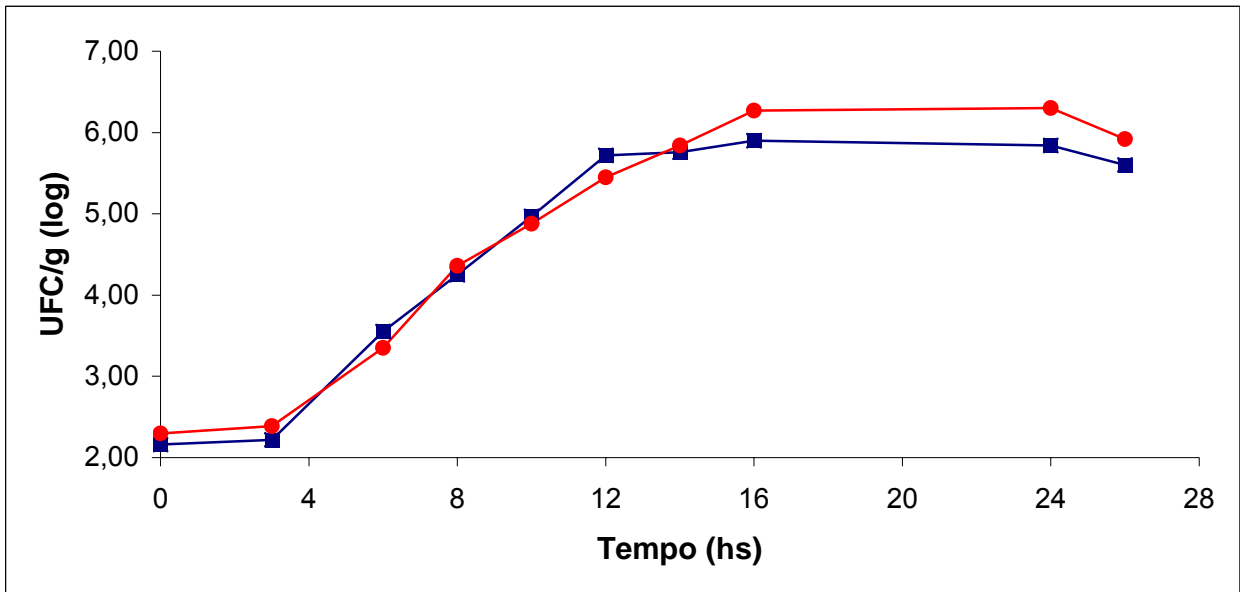


Figura 7 - Crescimento de *Salmonella* Enteritidis (log UFC/g) na casca de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 30°C. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (■ Fuyu, ● Rama Forte)

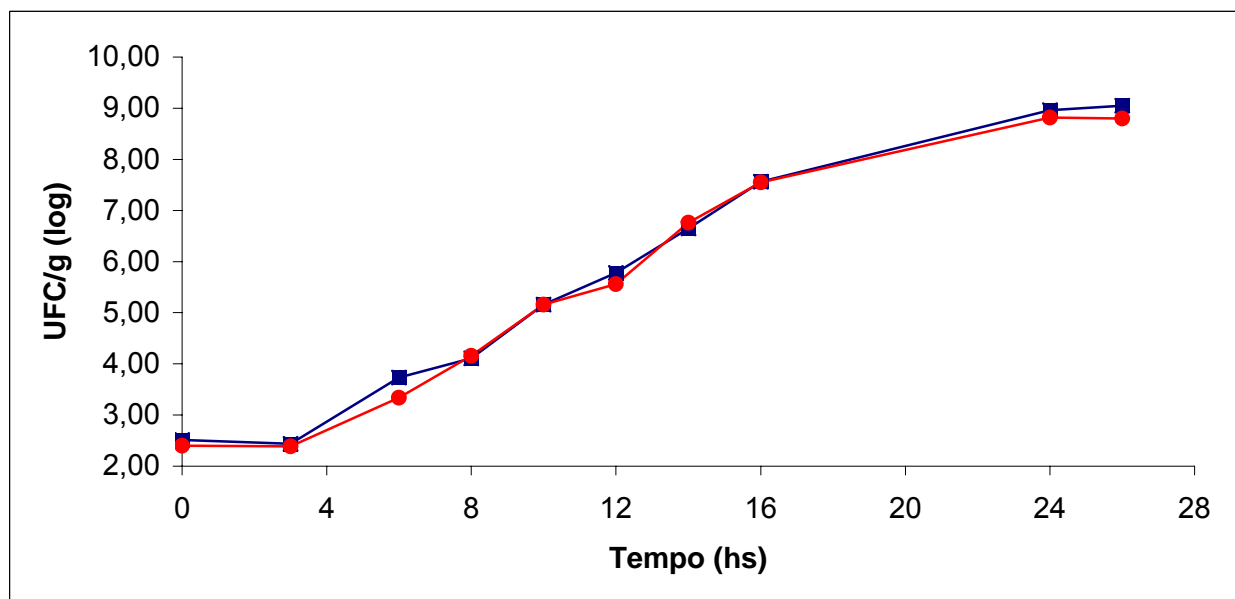


Figura 8 - Crescimento de *Salmonella* Enteritidis (log UFC/g) na polpa de caqui, das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' a 30°C. Os símbolos representam as médias de três diferentes experimentos (■ Fuyu, ● Rama Forte)

À 30°C, na casca (Figura 7), verificou-se um período de aproximadamente 3 horas (fase lag) para ambas as variedades, antes que um crescimento mais intenso

fosse observado. O mesmo fato pode ser observado para a polpa (Figura 8), ou seja, uma fase lag também de cerca de 3 horas. Na casca, foi também verificado, um aumento máximo, de 3,7 e 4,0 ciclos log, após aproximadamente 16 e 24 horas, atingindo populações máximas em torno de 5,0 e 6,0 log UFC/g, para as variedades Fuyu e Rama Forte, respectivamente. Na polpa, para essa mesma temperatura, observou-se que houve um aumento máximo na população de *S. Enteritidis*, ao redor de aproximadamente 6,5 ciclos log, após 26 horas, atingindo populações máximas de 9,08 e 8,82 log UFC/g para as variedades Fuyu e Rama Forte.

Verificou-se que *S. Enteritidis* tem condições de crescer tanto na polpa quanto na casca, a 30°C e que na variedade Fuyu foram atingidas maiores populações em relação à variedade Rama Forte. Esses resultados mostram que se o caqui estiver contaminado com *Salmonella* spp, ao ser acondicionado a temperatura ambiente pode contribuir com o crescimento deste patógeno em poucas horas, indicando grande risco à saúde do consumidor. Portanto, o ideal seria manter a fruta sob refrigeração para poder retardar o crescimento de *Salmonella* spp.

#### 5.3.4 Tempo de Geração e Crescimento Exponencial de *S. Enteritidis* na casca e na polpa

Baseado nesses experimentos foi possível calcular o tempo de geração médio (TG) e a taxa de crescimento exponencial (log UFC/g/h) para *S. Enteritidis* na casca e na polpa das diferentes variedades de caqui, como apresentado nas Tabelas 5 e 6.

**Tabela 5** – Tempos de geração (h)<sup>1</sup>, para *Salmonella* Enteritidis na casca e na polpa de caqui das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' incubados a diferentes temperaturas

Variedade de caqui	Temperatura de incubação (°C)					
	10°C		20°C		30°C	
	Casca	Polpa	Casca	Polpa	Casca	Polpa
Fuyu	8,37 <sup>A</sup> ±2,92	22,84 <sup>B</sup> ±3,01	5,39 <sup>B</sup> ±2,01	2,31 <sup>A</sup> ±0,12	1,09 <sup>A</sup> ± 0,35	0,77 <sup>A</sup> ±0,39
Rama Forte	6,00 <sup>A</sup> ±1,55	32,41 <sup>C</sup> ±4,24	2,71 <sup>A</sup> ±0,19	2,07 <sup>A</sup> ±0,19	1,08 <sup>A</sup> ±0,11	0,97 <sup>A</sup> ±0,03

<sup>1</sup>. Resultados expressos com a media de três(3) repetições e desvio padrão para cada parâmetro

<sup>2</sup> Resultados entre as variedades, seguidos por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade.

**Tabela 6** – Taxas de crescimento exponencial (UFC/g/h)<sup>1</sup>, para *Salmonella* Enteritidis na casca e na polpa de caqui das variedades 'Fuyu' e 'Rama Forte' incubados a diferentes temperaturas

Variedade de caqui	Temperatura de incubação (°C)					
	10°C		20°C		30°C	
	Casca	Polpa	Casca	Polpa	Casca	Polpa
Fuyu	0,05 <sup>A</sup> ±0,02	0,01 <sup>A</sup> ±0,01	0,06 <sup>B</sup> ±0,03	0,13 <sup>A</sup> ±0,01	0,29 <sup>A</sup> ±0,09	0,31 <sup>A</sup> ±0,01
Rama Forte	0,05 <sup>A</sup> ±0,02	0,01 <sup>A</sup> ±0,00	0,11 <sup>A</sup> ±0,01	0,15 <sup>A</sup> ±0,02	0,28 <sup>A</sup> ±0,03	0,31 <sup>A</sup> ±0,01

<sup>1</sup> Resultados expressos com a media de três (3) repetições e desvio padrão para cada parâmetro

<sup>2</sup> Resultados entre as variedades, para o mesmo microrganismo, seguidos por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente ao nível de 5 % de probabilidade.

A 10°C nota-se diferenças significativas entre a polpa e a casca para a mesma variedade, sendo que para a variedade Fuyu o tempo de geração na polpa foi cerca de 2,7 vezes mais longo na polpa do que na casca e para a variedade Rama Forte, o tempo de geração na polpa foi de aproximadamente 5,4 vezes maior na polpa (Tabela 5). Comparando o tempo de geração obtido entre as duas variedades, observou-se um tempo de geração cerca de 1,3 vezes mais longo na variedade Rama Forte do que na variedade Fuyu na casca e um tempo de geração de 1,4 vezes mais longo na variedade Rama Forte do que na variedade Fuyu para a polpa. A baixa temperatura apesar de ter reduzido (principalmente na casca), não evitou o crescimento de *S. Enteritidis*. Penteadó & Leitão (2003) obtiveram valores de tempo de geração para *S. Enteritidis* à 10°C de 7,31; 7,47; e 16,61 horas, respectivamente para polpas de melão (pH 5,9), melancia (pH 5,5) e mamão (pH 4,87.). Neste estudo foram obtidos, à 10°C, tempos de geração para *S. Enteritidis* na polpa de 22,84 e 32,41 h respectivamente para Fuyu (pH 6,3) e 'Rama Forte' (pH 5,5).

Em relação à taxa de crescimento exponencial (Tabela 6), tanto para a casca, quanto para a polpa, diferenças significativas não foram observadas entre as variedades.

A 20°C, o tempo de geração foi cerca de 2 (duas) vezes mais longo na casca do que na polpa para a variedade Fuyu. Para *Salmonella* Enteritidis Penteado & Leitão (2003) obtiveram valores de tempo de geração de 1,69; 1,60 e 1,74 horas, respectivamente para polpas de melão (pH 5,9), melancia (pH 5,5) e mamão (pH 4,87.) Os dados deste estudo são bastante semelhantes àqueles obtidos pelos autores citados principalmente para as polpas de melão e melancia que apresentaram pHs similares aos das variedades de caqui estudadas, ou seja, valores de tempo de geração de 2,31 e 2,07 horas para *S. Enteritidis* respectivamente para as variedades Fuyu e Rama Forte. As taxas de crescimento exponencial (Tabela 6) diferiram significativamente entre a casca da variedade Fuyu, com as demais, apresentando uma taxa de crescimento exponencial significativamente menor (praticamente a metade) daquele observado para as demais situações.

A 30°C, os tempos de geração obtidos não diferiram significativamente entre as variedades e entre a polpa e a casca. Penteado e Leitão (2003) obtiveram valores de tempo de geração para *S. Enteritidis* de 0,69; 0,51 e 0,66 horas, respectivamente para as polpas de melão (pH 5,9), melancia (pH 5,5) e mamão (pH 4,87.), próximos aos obtidos neste estudo. As taxas de crescimento exponencial também não diferiram significativamente entre as variedades e entre a polpa e casca.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que não só a polpa, como a casca do caqui, são bons substratos para a sobrevivência e crescimento de *Salmonella* Enteritidis e que baixas temperaturas (10°C) retardam mas não previnem o crescimento dessa bactéria. A 20 e 30°C o tempo de geração e a taxa de crescimento exponencial não diferiram de maneira acentuada entre a casca e a polpa.

Os resultados da presente pesquisa indicam que, devido ao hábito comum do consumo de caqui com casca, a sua exposição a temperatura ambiente por várias horas ou dias antes do consumo e ao o risco potencial de contaminação pelo patógeno estudado, boas práticas agrícolas e de higiene durante o cultivo, manuseio pós-colheita e a nível familiar devem ser rigorosamente obedecidos para não comprometer a segurança alimentar desse fruto.



## REFERÊNCIAS

AL-HINDAWI, N.; RISHED, R. Presence and distribution of *Salmonella* species in some local foods from Baghdad city, Iraq. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 42, p. 877-880, 1979.

ASPLUND, K.; NURMI, E. The growth of salmonellae in tomatoes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 13,, n. 2, p. 177-182, 1991. Disponível em: <<http://www.probe.br/sciencedirect.html>>. Acesso em: 12 July 2006.

BENATO, E. A.; SIGRIST, J. M. M.; ROCHA, P. Manuseio, aspectos fitossanitários e logística de caqui pós-colheita. **Toda Fruta**, São Paulo, 27 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br/todafruta/institucional.asp?menu=174>>. Acesso em: 13 fev. 2006.

BEUCHAT, L. R.; SCOUTEN, A. J. Factors affecting survival, growth, and retrieval of *Salmonella* Poona on intact and wounded cantaloupe rind and in stem scar tissue. **Food Microbiology**, London, v. 21, p. 683-694, 2004. Disponível em: <<http://probe.sciencedirect.html>>. Acesso em: 12 Apr. 2007.

BLOSTEIN, J. An outbreak of *Salmonella* Javiana associated with consumption of watermelon. **Journal Environmental Health**, Denver, v. 56, p. 29-31, 1993.

BORDINI, M. E. B.; RISTORI, C. A.; JAKABI, M.; GELLI, D. S. Incidence, internalization and behavior of *Salmonella* in mangoes, var. Tommy Atkins. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 1002 – 1007, 2007. Disponível em: <<http://probe.sciencedirect.html>>. Acesso em: 5 Sept. 2007.

CASTRO, G. P. P. **Colonização e trânsito intestinal de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium em frangos de corte no pré-abate**. 2000. 86 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Epidemiologic notes and reports multistate outbreak of *Salmonella* Poona infections – United States and Canada, 1991. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 40, p. 549-552, 1991. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00014966.htm>>. Acesso em: 28 Aug. 2006.

\_\_\_\_\_. CDC. Outbreak of *Salmonella* serotype Muenchen infections associated with unpasteurized orange juice – United States and Canada, June 1999. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 48, p. 582-585, 1999. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4827a2.htm>>. Acesso em: 07 Sept. 2006.

\_\_\_\_\_. CDC. Surveillance for food-borne disease outbreaks – United States, 1993 – 1997. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, p.1-51, 2000. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss4901a1.htm>>. Acesso em: 12 June 2006.

\_\_\_\_\_. CDC. A Multistate outbreak of *Salmonella* enterica serotype Baildon associated with domestic raw tomatoes. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 6, 2001. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol7no6/cummings.htm>>. Acesso em: 04 Sept. 2006.

\_\_\_\_\_. CDC. Multistate outbreaks of *Salmonella* serotype Poona infections associated with eating cantaloupe from Mexico – United States and Canada, 2000 – 2002. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 51, p.1044–1047, 2002a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5146a2.htm>>. Acesso em: 04 Sept. 2006.

\_\_\_\_\_. CDC. *Salmonella* enterica serotype Enteritidis Phage Type 4b outbreak associated with bean sprouts. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n.4, 2002b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol8no4/01-0213.htm>>. Acesso em: 04 Sept. 2006.

\_\_\_\_\_. CDC. Outbreaks of *Salmonella* infections associated with eating Roma tomatoes – United States and Canada, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 54, p. 325-328, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5413a1.htm>>. Acesso em: 04 Sept. 2006.

CORSATO, C. E. **Fenologia e carboidratos de reserva do caquizeiro (*Diospyros kaki*, L.) 'Rama Forte' em clima tropical**. 2004. 42 p. Tese (Doutorado em Horticultura) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

EDUARDO, M. B. P.; MELLO, M. L. R.; KATSUYA, E. M.; MORAES, I. R.; FERNÁNDES, S. A.; GUARNIERI, C. E. **Manual de doenças transmitidas por alimentos e água: *Salmonella* Enteritidis/ Salmoneloses**. Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE. São Paulo, março, 2003. Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF\\_59Sen.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/IF_59Sen.htm)>. Acesso em: 04 jun. 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA – Center for Food Safety and Applied Nutrition. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**. “The Bad Bug Book”, 1998. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>>. Acesso em: 08 Feb. 2006.

\_\_\_\_\_. FDA – Center for Food and Safety and Applied Nutrition 2001, Jan. 30 FDA. **Survey of Imported Fresh Produce**. FY 1999. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/prodsur6.html>>. Acesso em 10 Sept. 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182 p.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 655 p.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DA FRUTA – IBRAF. **Informativo, 2004**. São Paulo, 2004. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/estatisticas/producao.asp>>. Acesso em: 8 ago. 2007.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA – IEA. **A cultura do caqui em São Paulo**. São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=2508>>. Acesso em: 23 maio 2007.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7th ed. New York: Springer, 2005. 790 p.

KAUFMANN, S. H. E.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. B. Introduction: microbiology and immunology lessons learned from *Salmonella*. **Microbes and Infection**, Berlin, Germany, v. 3, n. 14 e 15, p. 1177-1181, Nov. / Dec. 2001. Disponível em: <<http://www.probe.br/sciencedirect.html>>. Acesso em : 03 Apr. 2006.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; ALAVIDZE, Z.; JANISIEWICZ, W. J.; FUCHS, Y.; CAMP, M. J.; CHIGHLADZE, E.; SULAKVELIDZE, A. . Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: A model study. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, p. 1116-1121, 2001.

LIAO, C. H.; SAPERS, G. M. Attachment and growth of *Salmonella* Chester on apple fruits and in vivo response of attached bacteria to sanitizer treatments. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, p. 876-883, 2000.

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

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. In: BROCK, T. D. **Biology of microorganisms**. 8 th ed. Prentice-Hall, New Jersey, p. 153, 1997.

MEDRANO, S. M. A.; ITURRIAGA, M. H.; ESCARTIN, E. F. Indicator and pathogenic bacteria in guacamole and their behavior in avocado pulp. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 21, p. 233-244, 2001.

MONGE, R.; ARIAS, M. L.; ANTILLON, F.; UTZINGER, D. Calidad microbiológica de frutas que se venden en Puestos Callejeros de San José, Costa Rica. **Archivo Latinoamericano de Nutrición**, Caracas, v. 45, p. 117-121, 1995.

MUÑOZ, V. R. S. **Destanização do caqui (*Diospyrus kaki* L.) “Rama Forte”**. 2002. 164 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

NICOLETI, J. F. **Secagem de caqui em condições controladas: efeito sobre a qualidade do produto e consumo energético.** 2005. 123 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

PALÚ, A. P.; TIBANA, A.; TEIXEIRA, L. M.; MIGUEL, M. A. L.; PYRRHO, A. dos S; LOPES, H. R. Avaliação microbiológica de frutas e hortaliças, servidas em restaurantes *self-service* privados da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 67 – 74, set. 2002.

PARISH, M. E. Coliforms. *Escherichia coli* and *Salmonella* Serovars associated with a citrus-processing facility implicated in a salmonellosis outbreak. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 62, p. 280-284, 1998.

PARISH, M. E.; NARCISO, J. A.; FRIEDRICH, L. M. Survival of *Salmonella* in orange juice. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 17, p. 273-281, 1997.

PENTEADO, A. L.; LEITÃO, M. M. F. **Incidência e desenvolvimento de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. em frutas de baixa acidez.** 2003. 117 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

POPPE, C. **Salmonellosis in poultry and people.** Supplement: World poultry special (production processing marketing). Misset International, p. 13-14, May, 1996.

ROERING, A. M.; LUCHANSKY, J. B.; IHNOT, A. M.; ANSAY, S. E.; KASPAR, C. W.; INGHAML, S. C. Comparative survival of *Salmonella* Typhimurium DT 104, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7 in preservative-free apple cider and simulated gastric fluid. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 263-269, 1999. Disponível em: <<http://probe.sciencedirect.html>>. Acesso em: 8 Aug. 2006.

SAEED, A. M; GAST, R. K.; POTTER, M. E.; WALL, P. G. ***Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals : epidemiology, pathogenesis, and control.** Ames: Iowa State University Press, 1999. 443p.

SALLEH, N. A.; RUSUL, G.; ZAITON, H.; REEZAL, A.; ISA, S. H.; NISHIBUCHI, M.; RADU, S. Incidence of *Salmonella* spp. in raw vegetables in Selangor, Malaysia. **Food Control**, Malaysia, v. 14, p. 475 – 479, 2003. Disponível em: <<http://probe.sciencedirect.html>>. Acesso em: 28 Dec. 2005.

SATO, G.S.; ASSUMPÇÃO, R. Mapeamento e análise da produção do caqui no Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 32, n.6, p. 47-54, 2002.

SILVA, N.; JUNQUEIRA V. C. A.; SILVEIRA N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.

SIVAPALASINGAM, S.; BARRET, E.; KIMURA, A; VAN DUYN, S.; DE WITT, W.; YING, M.; FRISCH, A.; PHAN, Q.; GOULD, E.; SHILLAM, P.; REDDY, V.; COOPER, T.; HOEKSTRA, M.; HIGGINS, C.; SANDERS, J. P.; TAUXE, R. V.; SLUTSKER, L. A multistate outbreak of *Salmonella enterica* serotype Newport infection linked to mango consumption: Impact of water-dip disinfestation technology. **Clinical Infectious Disease**, Chicago, v. 37, p. 1585-1590, 2003. Disponível em: <<http://www.journals.uchicago.edu/cgi-bin/resolve?id=doi:10.1086/379710>>. Acesso em: 29 Aug. 2006.

TIBA, M. A. **Estudo do armazenamento de polpa de caqui (*Diospyros kaki* L.) congelado para elaboração de subprodutos**. 1996. 117 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718 p.

UKUKU, D. O. Effect of sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and recontamination with *Salmonella*. **Food Microbiology**, London, v. 23, p. 289-293, 2005. Disponível em: <<http://probe.sciencedirect.html>>. Acesso em: 24 Aug. 2006.

UKUKU, D. O.; SAPERS, G. M. Effect of sanitizer treatments on *Salmonella* Stanley attached to the surface of cantaloupe and cell transfer to fresh-cut tissues during cutting practices. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, p. 1286-1291, 2001.

UKUKU, D. O.; SAPERS, G. M. Effect of time before storage and storage temperature on survival of *Salmonella* inoculated on fresh-cut melons. **Food Microbiology**, London, v. 24, p. 288-295, 2007. Disponível em: <<http://probe.sciencedirect.html>>. Acesso em: 22 Sept. 2007.

USER'S GUIDE. **BAX® System PCR assay with automated detection for bacterial screening**. Wilmington, DE: Dupont Qualicon, 2000.

VISSONI, C. L. Z. **Resistência a antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. isoladas de carcaças de frango**. 2003. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

VISWANATHAN, P.; KAUR, R. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. **International Journal of Hygiene Environmental Health**, Mumbai, v. 203, p. 205-213, 2001. Disponível em: <<http://probe.sciencedirect.html>>. Acesso em: 2 Feb. 2006.

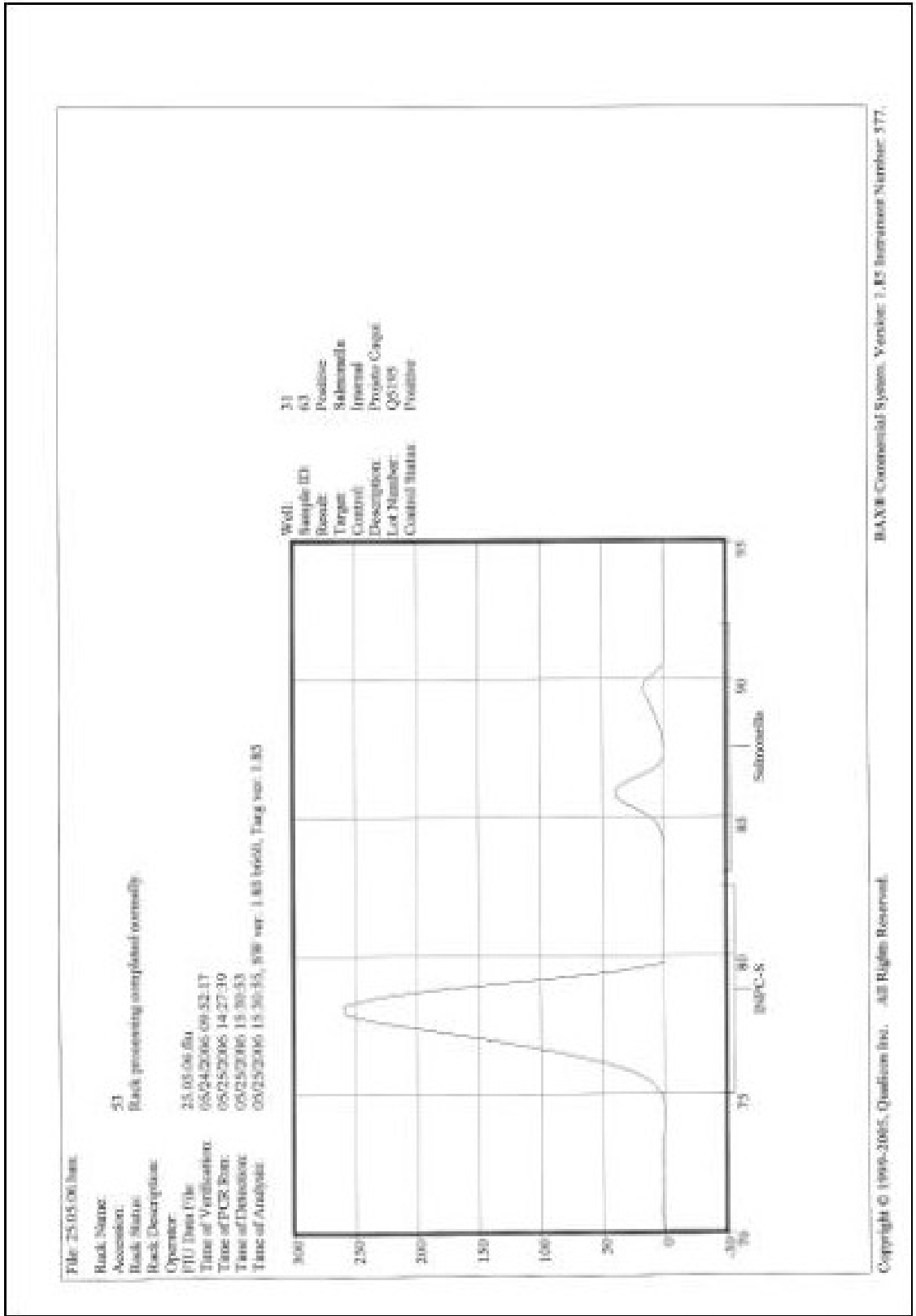
ZHUANG, R. Y.; BEUCHAT, L. R.; ANGULO, F. J. Fate of *Salmonella* Montevideo on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 2127-2131, 1995.

# **ANEXOS**

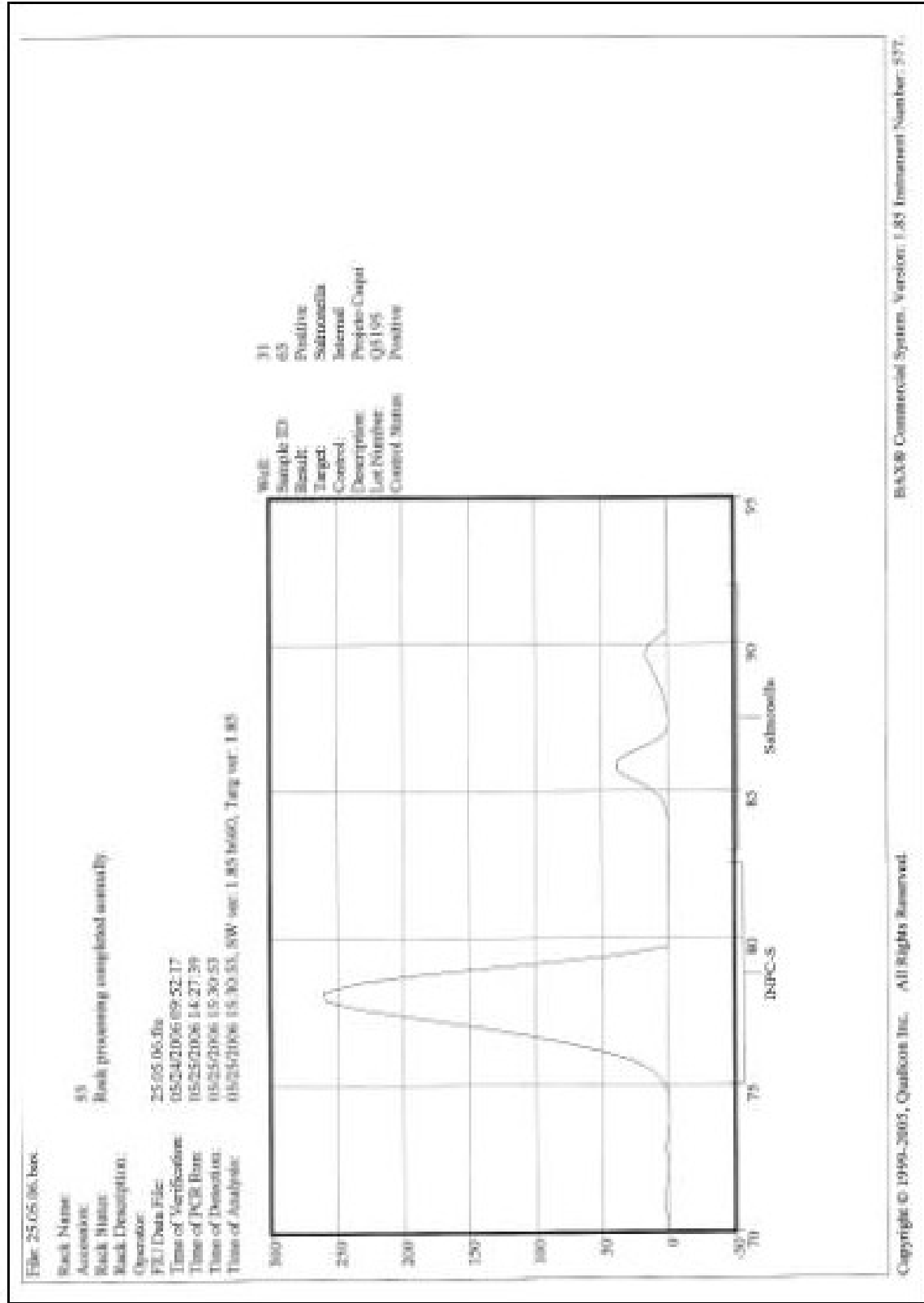




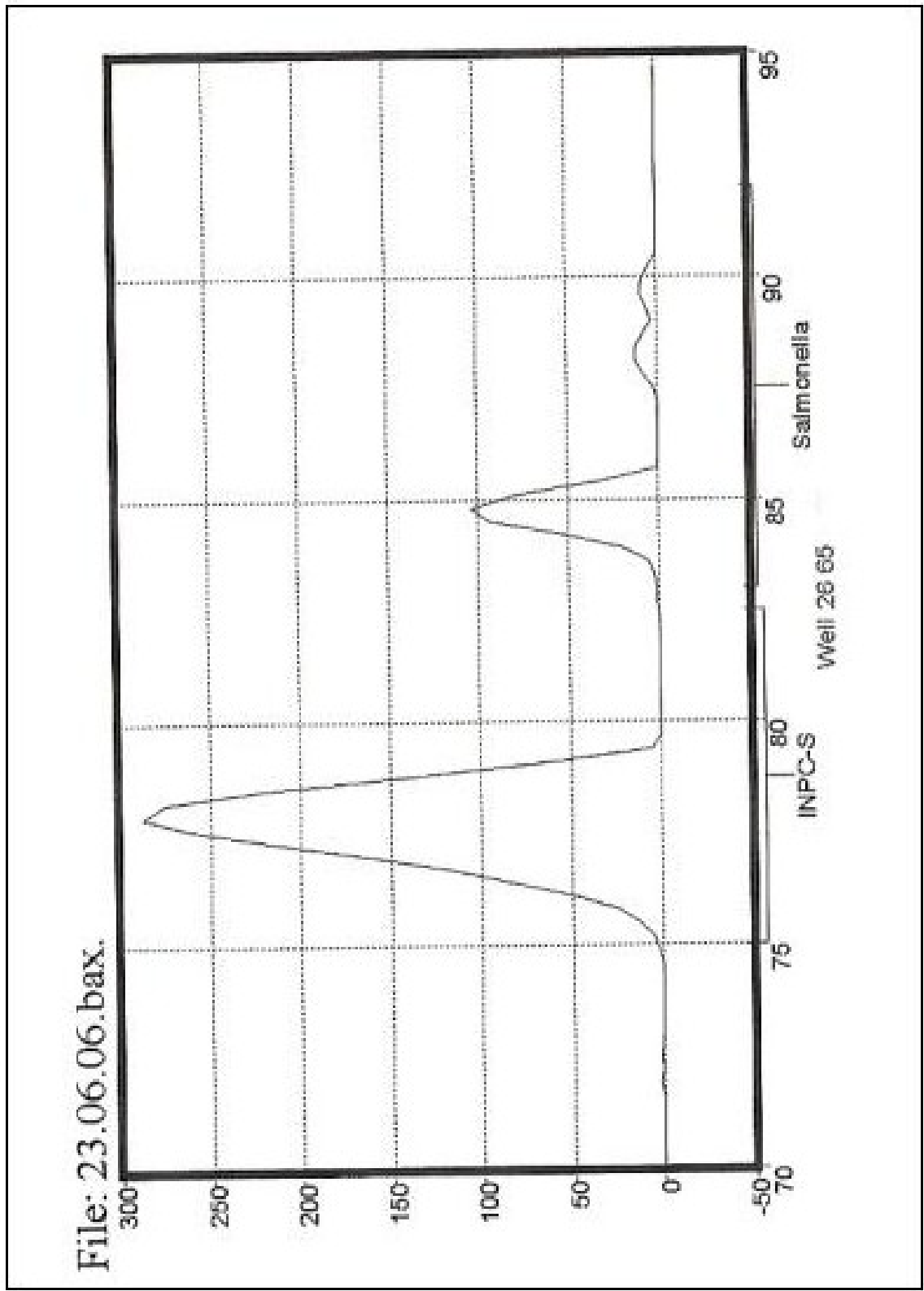
ANEXO B – Perfil da curva de fusão (melting curve) de *Salmonella* spp. da amostra positiva



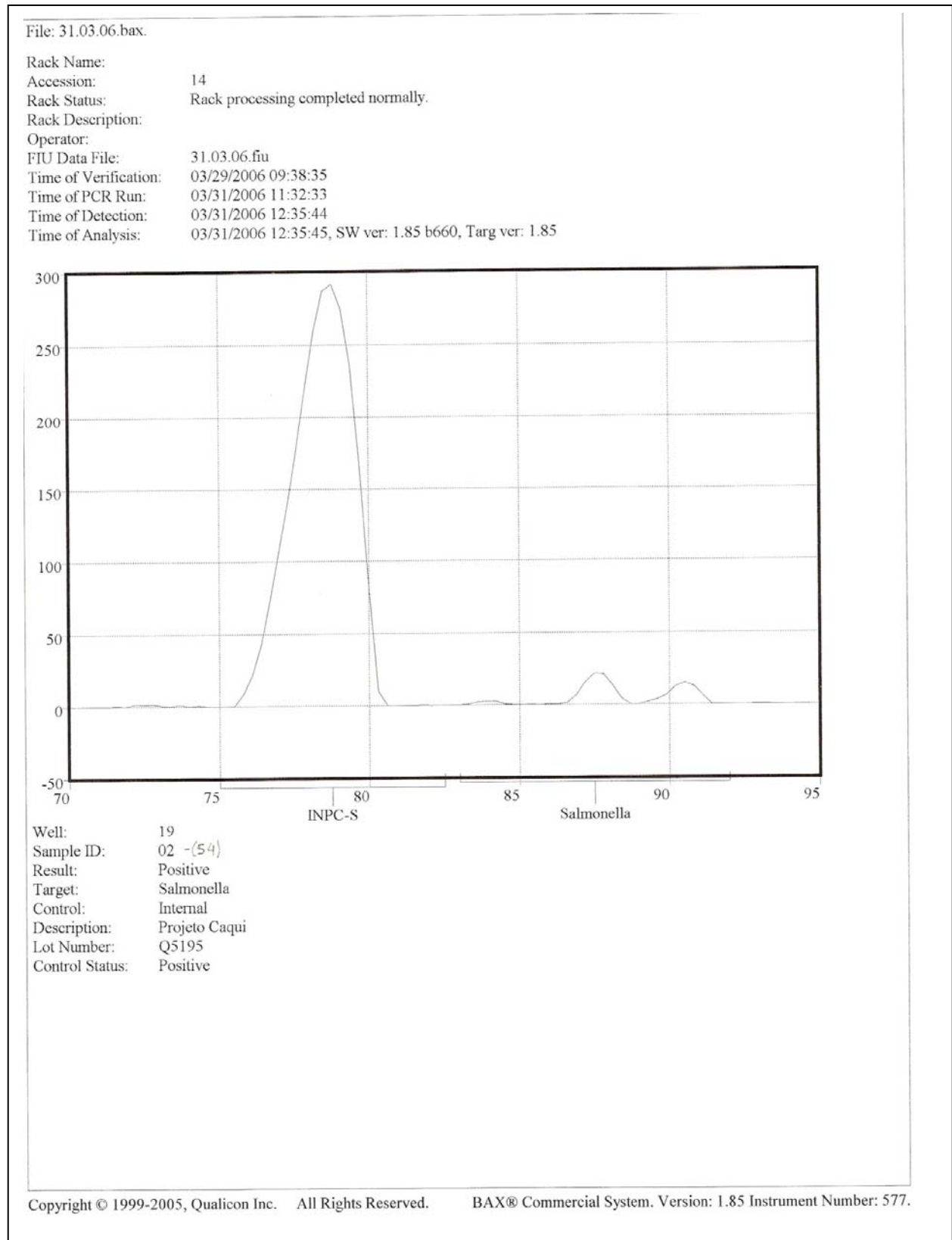
ANEXO C – Perfil da curva de fusão (melting curve) de *Salmonella* spp. da amostra positiva



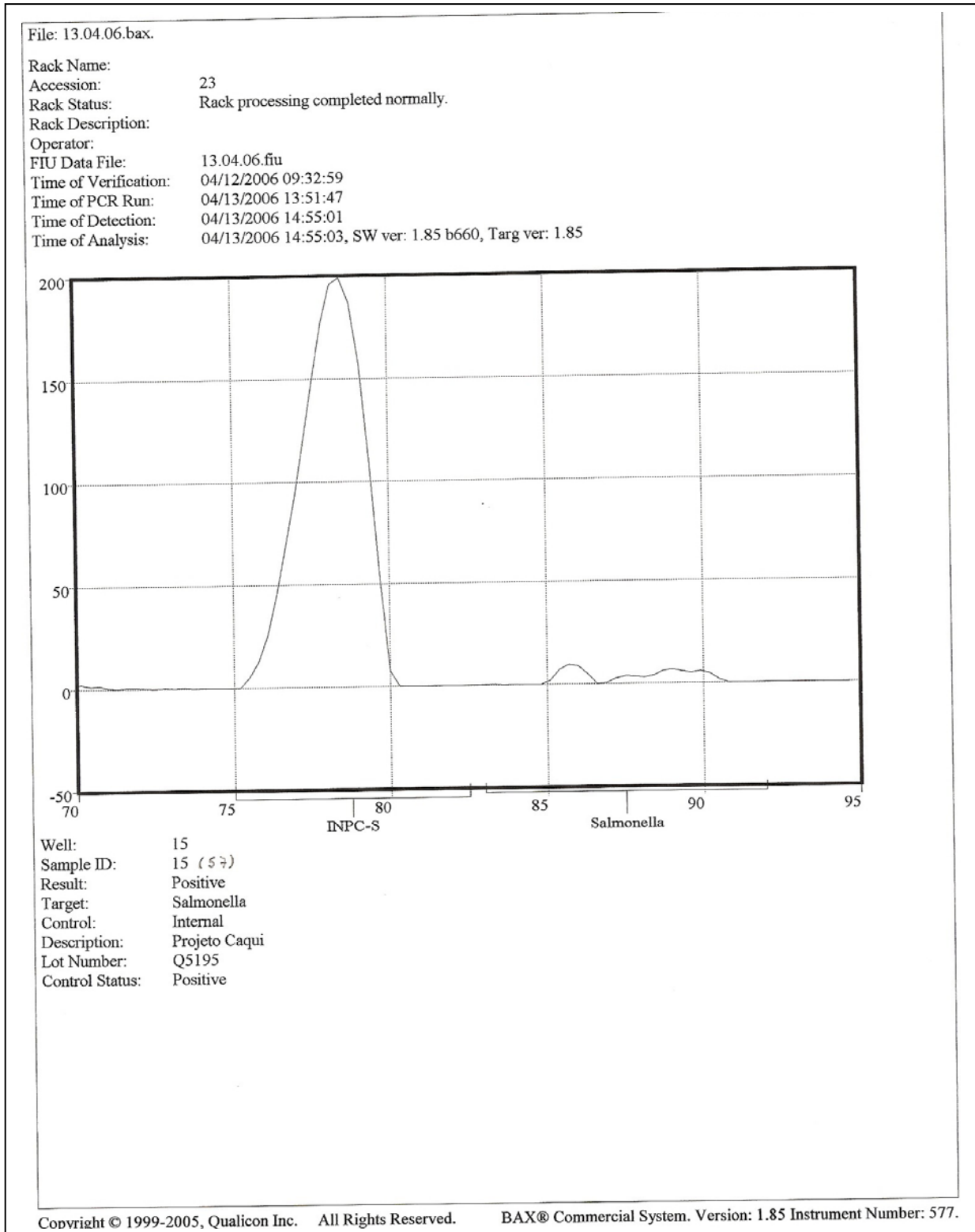
ANEXO D – Perfil da curva de fusão (melting curve) de *Salmonella* spp. da amostra positiva



## ANEXO E – Perfil da curva de fusão (metting curve) de *Salmonella* spp. da amostra positiva



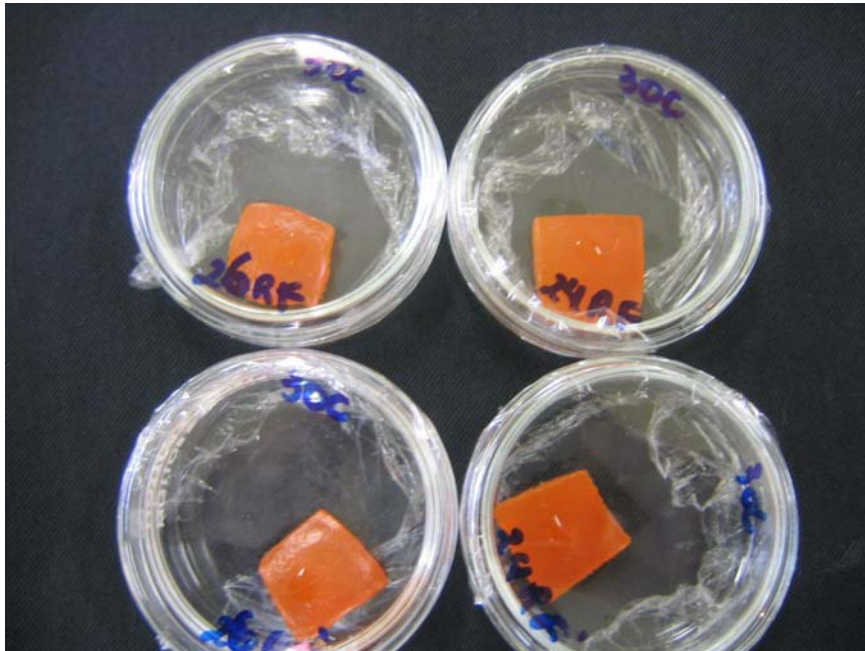
ANEXO F – Perfil da curva de fusão (metting curve) de *Salmonella* spp. da amostra positiva



ANEXO G – Cascas de caquis utilizados nas curvas de crescimento



G.1 – Caqui 'Fuyu'



G.2 – Caqui 'Rama Forte'

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)