



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

**ESTUDO DE PERIGOS BIOLÓGICOS PRESENTES NA SUPERFÍCIE  
DE FRUTOS DE CASCA RIJA E NAS FOLHAS DE PRODUTOS  
FRESCOS**

Por

Maria Lúcia Fernandes de Oliveira e Brito de Noronha

Outubro 2011



**CATÓLICA**  
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO  
Escola Superior de Biotecnologia

**ESTUDO DE PERIGOS BIOLÓGICOS PRESENTES NA SUPERFÍCIE  
DE FRUTOS DE CASCA RIJA E NAS FOLHAS DE PRODUTOS  
FRESCOS**

Tese apresentada à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa  
para obtenção do grau de Mestre em Inovação Alimentar

Por

Maria Lúcia Fernandes de Oliveira e Brito de Noronha

Local: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Orientação: Doutora Paula Teixeira

Co-orientação: Doutora Joana Silva

Outubro 2011



## Resumo

Os frutos e vegetais consumidos crus tornam-se potenciais veículos de transmissão de microrganismos patogénicos, devido à impossibilidade da aplicação de tratamentos térmicos, que reduzem consideravelmente os perigos biológicos. A alface é um dos legumes mais consumidos em Portugal e o aproveitamento dos seus nutrientes é favorecido pelo consumo cru das suas folhas, as quais permanecem a descoberto desde a produção até à fase de distribuição. Os frutos possuem uma barreira física, a casca, que os protege da invasão e proliferação microbiana. No entanto, muitos contêm cascas rugosas e com texturas muito pronunciadas que podem contribuir para um aumento significativo da carga microbiana transportada e, por conseguinte, resultar na contaminação da parte interna durante o processo de descasque. Desta forma, o objectivo do presente trabalho foi avaliar a carga microbiana existente na superfície de frutos de cascas rugosas e com fendas pronunciadas, designadamente ananases e meloas, e também em folhas de alfaces, analisando as variedades, origens e locais de distribuição dos produtos hortofrutícolas referidos. Para cada amostra foi efectuada a enumeração de microrganismos totais, de *Enterobacteriaceae*, de *Escherichia coli*, de *Staphylococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.. Nas alfaces verificaram-se diferenças significativas relativas aos locais de distribuição, sendo que as amostras adquiridas em supermercados apresentaram contagens de *E. coli* mais baixas do que as dos restantes estabelecimentos. Observou-se contaminação fecal em 47,5 % das alfaces analisadas e 15 % continham *L. monocytogenes*. Nas cascas dos frutos constataram-se diferenças significativas relativas aos países de origem e locais de distribuição. Os ananases provenientes do Equador e as meloas oriundas de Marrocos demonstraram contagens de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae* superiores, respectivamente, em relação aos outros países. Obtiveram-se, de forma geral, contagens bacterianas mais baixas para os frutos adquiridos em hipermercados, comparando com os outros estabelecimentos. 5 % dos ananases apresentaram contaminação fecal e 2,5 % estavam contaminados com *L. monocytogenes*. Nas meloas não foram encontradas *E. coli*, *L. monocytogenes* ou *Staphylococcus* coagulase positiva. As estirpes de *L. monocytogenes* isoladas pertenciam aos serogrupos 2 (1/2c ou 3c) ou 4 (4b, 4d ou 4e) e nenhuma mostrou ser resistente aos fármacos habitualmente utilizados na terapia de listeriose. Todos os isolados *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos possuíam características semelhantes e nenhum demonstrou ser multirresistente a antibióticos. Não foi detectada *Salmonella* spp. nos produtos hortofrutícolas analisados.



## Abstract

Fruits and vegetables eaten raw are potential vehicles of pathogens due to the impossibility of applying thermal treatments, which would considerably reduce biological hazards that might be present. Lettuce is one of the most consumed salad vegetables in Portugal and absorption of nutrients is favoured by the consumption of raw leaves, which remain uncovered from production to the distribution phase. Fruits have a physical barrier, the peel, which protects them from microbial contamination and proliferation. However, many fruits possess rough peels and very pronounced textures that can contribute to a significant increase in microbial load transported and therefore result in contamination of the interior of the fruit during peeling. The aim of this study was to evaluate the microbial load on the surface of fruits with rough and very pronounced textured peels, namely pineapples and melons, as well as leaf lettuce, analyzing the varieties, countries of origin and distribution sites of these products. Enumeration of total microorganisms, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* and coagulase-positive staphylococci, as well as detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp., were performed for all samples. Significant differences were observed in lettuce samples according to distribution sites: samples purchased at supermarkets showed lower *E. coli* counts than those of other establishments. Faecal contamination was found in 47.5 % of lettuce samples and 15 % were contaminated with *L. monocytogenes*. Significant differences were observed in fruit peels according to country of origin and distribution sites. Pineapples from Ecuador and melons from Morocco had higher total microorganism and *Enterobacteriaceae* counts, respectively, than other countries. The fruits purchased in hypermarkets showed lower bacterial counts when compared with other establishments. 5 % of pineapples presented faecal contamination and 2.5 % were contaminated with *L. monocytogenes*. Melon samples were negative for *E. coli*, *L. monocytogenes* and coagulase-positive staphylococci. *L. monocytogenes* isolates belonged to serogroups 2 (1/2c or 3c) or 4 (4b, 4d and 4e) and none were found to be resistant to antibiotics commonly used in therapy of listeriosis. All coagulase-positive staphylococci had similar characteristics and none exhibited multidrug resistance. *Salmonella* spp. was not detected in fruits and vegetables analyzed in this study.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer à Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, na pessoa de sua directora Professora Doutora Isabel Vasconcelos, que me permitiu a concretização deste projecto, facilitando instalações, equipamentos e todo o material necessário.

Às minhas orientadoras, Doutora Paula Teixeira e Doutora Joana Silva, que me aceitaram como aluna e me auxiliaram de forma incansável durante todo o tempo de realização deste trabalho. Agradeço pela forma como me integraram no grupo, pela confiança concedida e pela valiosa ajuda tanto a nível profissional, como a nível pessoal em momentos bastante complicados!

Ao Doutor Paul Gibbs, ao Doutor Gonçalo Almeida e à Dr.<sup>a</sup> Cristina Mena pelas opiniões e críticas relevantes em determinadas partes do trabalho.

Ao Rui Magalhães e pessoal do Laboratório de Microbiologia do CINATE pela atenção dispensada e auxílio em alguns métodos.

À Vânia Ferreira pela dedicação e horas de trabalho, assim como pela amizade e carinho demonstrados ao longo do tempo.

Ao Engenheiro Leonel Manso, coordenador do controlo de qualidade dos produtos frescos do Grupo Auchan, sempre prestável no esclarecimento de dúvidas relativas ao comportamento dos distribuidores alimentares face aos produtos hortofrutícolas.

Aos meus colegas e amigos do laboratório, Ricardo Freixo, Ângela Rêgo, Ana Castro, Ana Carvalheira, Cátia Eusébio e Alexandra Ribeiro, pelo apoio nas dificuldades, paciência nos desabafos e boa disposição durante o tempo de trabalho.

Aos meus queridos pais, Eurico Noronha e Helena Noronha, que permitiram que eu realizasse este objectivo, compreendendo-o e apoiando sempre!

Ao meu namorado, Nuno Costa, pelo estímulo, críticas positivas, perseverança e apoio ao longo de todo o meu percurso neste trabalho.

Um muito Obrigada!





## Índice

Resumo.....	3
Abstract.....	5
Agradecimentos.....	7
Lista de Figuras.....	11
Lista de Tabelas.....	13
Introdução.....	15
Sector Hortofrutícola.....	15
Como Acontece a Contaminação Biológica.....	16
Frutos.....	17
Alface.....	18
Microrganismos Contaminantes.....	19
Família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	21
<i>Escherichia coli</i> .....	21
<i>Salmonella</i> spp. ....	22
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
Material e Métodos.....	27
Produtos Analisados.....	27
Caracterização Microbiológica das Amostras.....	27
Caracterização das estirpes isoladas.....	28
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	28
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	30
Análise Estatística.....	32
Resultados e Discussão.....	33
Caracterização Microbiológica das Amostras.....	33
Alface.....	33
Ananás.....	41
Melo.....	50
Caracterização das estirpes isoladas.....	59
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	59
<i>Listeria monocytogenes</i> .....	65

Conclusões Gerais .....	71
Trabalho Futuro .....	73
Bibliografia.....	75

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação das duas variedades de alface analisadas. A - Alface lisa (De: <a href="http://www.gaertnerei-willmann.de/produktdetails/items/kopfsalat.html">http://www.gaertnerei-willmann.de/produktdetails/items/kopfsalat.html</a> ; Acedido em: 5 de Novembro de 2011); B - Alface frisada (De: <a href="http://www.montedolaranjal.com/pt-pt/tag/alface-frisada/">http://www.montedolaranjal.com/pt-pt/tag/alface-frisada/</a> ; Acedido em: 5 de Outubro de 2011). .....	33
<b>Figura 2.</b> Contagem de microrganismos totais em alfaces lisas e frisadas. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	34
<b>Figura 3.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em alfaces lisas e frisadas. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	34
<b>Figura 4.</b> Contagem de <i>E. coli</i> em alfaces lisas e frisadas. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	35
<b>Figura 5.</b> Contagem de microrganismos totais em alfaces adquiridas em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.....	36
<b>Figura 6.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em alfaces adquiridas em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	37
<b>Figura 7.</b> Contagem de <i>E. coli</i> em alfaces adquiridas em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	37
<b>Figura 8.</b> Contagem de microrganismos totais em alfaces adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	39
<b>Figura 9.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em alfaces adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	40
<b>Figura 10.</b> Contagem de <i>E. coli</i> em alfaces adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	40
<b>Figura 11.</b> Representação do tipo de fruto analisado. A - Ananás dos Açores (De: <a href="http://veggies-only.blogspot.com/2008/06/how-to-grow-pineapples.html">http://veggies-only.blogspot.com/2008/06/how-to-grow-pineapples.html</a> ; Acedido em: 5 de Novembro de 2011); B - Abacaxi (De: <a href="http://incaper.web407.uni5.net/revista.php?idcap=978">http://incaper.web407.uni5.net/revista.php?idcap=978</a> ; Acedido em: 5 de Novembro de 2011).....	43
<b>Figura 12.</b> Contagem de microrganismos totais nas cascas de dois frutos, ananás e abacaxi. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.....	43
<b>Figura 13.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> nas cascas de dois frutos, ananás e abacaxi. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	44
<b>Figura 14.</b> Contagem de microrganismos totais em ananases adquiridos em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.....	45
<b>Figura 15.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em ananases adquiridos em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.....	46
<b>Figura 16.</b> Contagem de microrganismos totais de ananases oriundos de diferentes países. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	47
<b>Figura 17.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> de ananases oriundos de diferentes países. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.....	48
<b>Figura 18.</b> Contagem de microrganismos totais nos ananases adquiridos em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	49
<b>Figura 19.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> nos ananases adquiridos em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	49
<b>Figura 20.</b> Representação das duas variedades de meloa analisadas. A - Meloa Cantaloupe (De: <a href="http://www.asklubo.com/en/fooddrinks/howtoavoidbuyingrottencantaloupe">http://www.asklubo.com/en/fooddrinks/howtoavoidbuyingrottencantaloupe</a> ; Acedido em: 5 de Novembro de 2011); B - Meloa Gália (De:	

<a href="http://www.leshop.ch/leshop/Main.do/direct/en/Supermarket/-17789/-10208/12463;">http://www.leshop.ch/leshop/Main.do/direct/en/Supermarket/-17789/-10208/12463;</a> Acedido em: 5 de Novembro de 2011). .....	51
<b>Figura 21.</b> Contagem de microrganismos totais de melões de duas variedades, Cantaloupe e Gália. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	51
<b>Figura 22.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> de melões de duas variedades, Cantaloupe e Gália. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	52
<b>Figura 23.</b> Contagem de microrganismos totais em melões adquiridas em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	53
<b>Figura 24.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em melões adquiridas em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	54
<b>Figura 25.</b> Contagem de microrganismos totais em melões oriundas de diferentes países. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	55
<b>Figura 26.</b> Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em melões oriundas de diferentes países. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	56
<b>Figura 27.</b> Contagem de microrganismos totais nas melões adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	57
<b>Figura 28.</b> Contagem <i>Enterobacteriaceae</i> nas melões adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada. ....	57
<b>Figura 29.</b> Gel de agarose com o resultado do PCR Multiplex para detecção dos genes 16S rRNA, <i>mecA</i> e <i>nuc</i> amplificados simultaneamente. M - marcador; A – <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (que possui os genes 16S rRNA e <i>nuc</i> ); B – <i>S. epidermidis</i> DSM 20044 (que possui apenas 16S rRNA); C - <i>S. aureus</i> DSM 11729 (que possui os genes 16S rRNA, <i>nuc</i> e <i>mecA</i> ); 1 a 7 – isolados dos produtos hortofrutícolas; 8 – Branco. ....	61
<b>Figura 30.</b> Gel de agarose com o resultado do PCR Multiplex para detecção dos fragmentos de DNA <i>lmo1118</i> (906 pb), <i>lmo0737</i> (691 pb), ORF2110 (597 pb), ORF2819 (471 pb) e <i>prs</i> (370 pb) amplificados simultaneamente. M - marcador; R1 - controlo <i>L. monocytogenes</i> NCTC 11994 (correspondente ao serótipo 4b); R11 - controlo <i>L. monocytogenes</i> CECT 911 (serótipo 1/2c); R13 - controlo <i>L. monocytogenes</i> CECT 936 (serótipo 1/2b); R16 - controlo <i>L. monocytogenes</i> CIP 104794 (serótipo 1/2a); 1A a 7B – isolados de <i>L. monocytogenes</i> adquiridos nas amostras dos produtos hortofrutícolas. ....	66

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Sequência de <i>primers</i> usados no PCR Multiplex para <i>S. aureus</i> , tamanho dos fragmentos e condições de PCR segundo o método de Zhang <i>et al.</i> (2004).....	29
<b>Tabela 2.</b> Sequência de <i>primers</i> usados no PCR Multiplex, tamanho dos fragmentos, serótipos correspondentes a cada fragmento e condições de PCR segundo o método de Doumith <i>et al.</i> (2004).....	31
<b>Tabela 3.</b> Média (em Log <sub>10</sub> (UFC/g)) da contagem de microrganismos totais e de <i>Enterobacteriaceae</i> para todas as amostras de cada produto hortofrutícola.....	58
<b>Tabela 4.</b> Resultado dos testes de identificação para os 7 isolados <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva obtidos, em comparação com espécies coagulase positiva conhecidas (Richardson <i>et al.</i> , 1992). .....	60
<b>Tabela 5.</b> CMI obtida para cada isolado e referente interpretação segundo o CLSI (2007) em relação a todos os antibióticos analisados. ....	64



## **Introdução**

A segurança alimentar é, cada vez mais, um assunto relevante no quotidiano dos consumidores. Está relacionada com a presença de perigos químicos, físicos e biológicos nos géneros alimentícios, os quais podem surgir em qualquer fase da cadeia alimentar, constituindo um risco para a saúde humana no acto de ingestão. A produção e o consumo de alimentos são indispensáveis em qualquer sociedade, o que leva à necessidade de um rigoroso controlo dos produtos que permita a protecção da saúde dos consumidores e evite consequências económicas, sociais ou mesmo ambientais negativas. O controlo deve aplicar-se desde a produção primária até ao produto final, tanto em alimentos originários da Comunidade Europeia, como para países externos. Este controlo torna-se por vezes complexo, como é o caso dos perigos biológicos no sector hortofrutícola (Anónimo, 2000a).

### **Sector Hortofrutícola**

Os frutos e vegetais crus ou minimamente processados fazem parte da dieta humana em todo o mundo. Pelo facto de não poderem ser submetidos a tratamentos que reduzem consideravelmente perigos biológicos, estes alimentos, essenciais a uma dieta equilibrada e rica em nutrientes, são potenciais veículos de transmissão de microrganismos patogénicos (De Roever, 1998; Viswanathan e Kaur, 2001).

Em países industrializados, os dados relativos a surtos de infecções/intoxicações alimentares associados com este tipo de produtos são pouco frequentes quando comparados a outros alimentos. Contudo, nos últimos anos, tem sido descrito um aumento da frequência desses surtos, resultantes de algumas alterações no sector alimentar (Altekruse *et al.*, 1997; Beuchat, 1998). Um exemplo patente das alterações referidas é o crescimento da importação e globalização do fornecimento de alimentos (em particular no caso dos frutos sazonais, com o intuito de serem vendidos durante todo o ano). A introdução de novos agentes patogénicos em certas áreas geográficas e conseqüente desenvolvimento de diferentes factores de virulência derivam muitas vezes dessa situação. A extensão do tempo entre a colheita e o consumo, o decréscimo da imunidade em certos segmentos da população e as mudanças nos hábitos alimentares (aumento do consumo de refeições fora de casa incluindo, na maior parte das vezes, saladas e o aumento do consumo de frutos e vegetais crus, resultante das



recomendações nutricionais para uma alimentação saudável), são outros exemplos das alterações citadas (Altekruse *et al.*, 1997). Em países em desenvolvimento, o número de surtos é superior, mas devido à falta de investigação e de vigilância epidemiológica nesses locais, a maioria dos casos passa despercebida e muito poucas situações são reportadas (Kaferstein *et al.*, 1997). Nestes países, a deficiente higiene, instalações inadequadas para preparação e armazenamento de alimentos, o uso contínuo de fertilizantes à base de matéria orgânica animal e utilização de recursos de água não tratada para sistemas de rega, são factores condicionantes de inúmeros surtos de infecções alimentares (Viswanathan e Kaur, 2001).

### **Como Acontece a Contaminação Biológica**

No ambiente de produção existem diversos elementos que ao contactarem com a planta são potenciais fontes de agentes patogénicos. Muitos dos microrganismos contaminantes fazem parte do meio ambiente onde crescem os frutos e os vegetais, nomeadamente do solo e da água. Mesmo que estas duas fontes de contaminação não tenham tido contacto com matéria orgânica animal, possuem uma microflora muito rica, que vai desde a presença de numerosas espécies de fungos, a vírus e bactérias ubíquas, como é o caso de *Listeria monocytogenes* (De Roever, 1998). Os animais e os trabalhadores agrícolas são também veículos de contaminação particularmente importantes. A presença de animais, selvagens ou domésticos, e insectos perto de pomares ou de campos contribui para uma probabilidade acrescida da ocorrência de agentes patogénicos em frutos e vegetais. As aves têm a capacidade de transportar os microrganismos, mesmo para locais distantes. Os insectos são importantes vectores de transmissão de microrganismos proveniente de esgotos, de materiais orgânicos em decomposição ou de fezes para as áreas de produção. Os animais domésticos, se tiverem acesso às zonas de cultivo, podem contaminar os produtos hortofrutícolas com a sua flora cutânea ou intestinal, principalmente legumes ou frutos que se desenvolvam em contacto com o solo. Por outro lado, o aproveitamento de estrume animal como fertilizante e de água não tratada para rega ou lavagem, são factores que, adicionados aos anteriormente descritos, aumentam a carga microbiana nos alimentos (De Roever, 1998). No entanto, a contaminação pode ocorrer também durante a colheita (manuseamento e materiais), transporte, processamento, armazenamento, comercialização ou mesmo em casa do consumidor (Beuchat, 1998; Anónimo, 2002).

## Frutos

Os grupos de microrganismos predominantes nos frutos vão depender das suas características físico-químicas (factores intrínsecos) e das condições ambientais onde se encontram (factores extrínsecos). Os factores intrínsecos incluem a actividade da água, o pH, o conteúdo em nutrientes, a presença de compostos e estruturas antimicrobianas e a microflora do alimento; os factores extrínsecos incluem a temperatura, a humidade relativa e o tipo de atmosfera em que se encontram.

A casca (barreira física) é um factor intrínseco presente em todos os frutos. Tem como função proteger o alimento, por exemplo, da invasão e proliferação microbiana. Muitos microrganismos conseguem sobreviver na superfície da casca mas, como não têm a capacidade de produzir enzimas adequadas à degradação desta, não alcançam os nutrientes do interior dos frutos e, por isso, não se multiplicam (com excepção de *Listeria innocua* que mostrou capacidade para crescer em cascas de meloas) (Behrsing *et al.*, 2003). Porém, estão presentes e se ocorrerem danos nesta estrutura biológica, seja durante a colheita, transporte ou armazenamento, a sua entrada é facilitada, permitindo a multiplicação microbiana e conseqüentemente a presença de microrganismos, patogénicos ou causadores de degradação, no alimento. Assim, a manutenção desta estrutura intacta é fundamental (De Roever, 1998; Behrsing *et al.*, 2003).

Muitos frutos possuem superfícies rugosas e texturas muito pronunciadas que, em certas espécies, contêm mesmo pequenas fendas. Este estilo de casca pode contribuir para um aumento significativo da carga microbiana transportada, comparando com o que se sucede em frutos de superfícies lisas. O tipo e o número de microrganismos presentes dependem do solo e da sua microflora residente, da aplicação de microflora não residente através de fertilizantes orgânicos de origem animal, água de rega não tratada ou proveniente de esgotos e condições atmosféricas (precipitação, humidade atmosférica, temperatura) (Beuchat, 1998; De Roever, 1998).

Nalguns frutos, como por exemplo ananases, meloas, melões, melancias e mangas, a casca não é comestível sendo removida antes do consumo. A presença de organismos patogénicos na sua superfície parece não ser tão crítica, comparando com as frutas ingeridas com casca. Contudo, na maioria dos casos, estes frutos não são lavados antes de serem descascados e o processo de remoção da casca pode resultar na contaminação da parte interna

por microrganismos que, aí, terão condições favoráveis para se desenvolverem e tornar estes produtos potencialmente perigosos para a saúde do consumidor (Beuchat, 1998).

Meloas e ananases tornam-se casos particulares deste estudo porque são constituídos por cascas rugosas, caracterizadas por múltiplas reentrâncias. A elevada manipulação a que estão sujeitos (por vezes devida à distância entre o local de origem e o local de consumo) e o tipo de práticas de higiene na produção (muitas vezes oriundos de países em desenvolvimento como o Equador e o Panamá) são factores que podem levar a um aumento significativo da carga microbiana na sua superfície (Klugman, 2010). Por outro lado, não é habitual a lavagem destes alimentos antes da remoção da casca. Os microrganismos que se encontram nas fendas ou rugosidades podem ser particularmente difíceis de retirar, contribuindo para a transferência de organismos patogénicos do exterior para o interior no processo de corte (contaminação inicial do produto) (Altekruse *et al.*, 1997). Além disso, têm sido documentadas doenças de origem alimentar associadas ao consumo de melões, meloas e ananases, demonstrando a capacidade de desenvolvimento microbiano na parte comestível destas frutas (Behrsing *et al.*, 2003; CDC, 2007b).

### **Alface**

O consumo de legumes ingeridos crus tem aumentado significativamente ao longo do tempo, devido à crescente preocupação dos consumidores pela saúde nutricional e tendência para dietas. As saladas de vegetais crus são servidas com frequência em todos os tipos de estabelecimentos de restauração, desde *fast food* a restaurantes familiares, sendo a alface (*Lactuca sativa* L.) um dos vegetais mais utilizados (Lin *et al.*, 1996; De Roever, 1998; Barry-Ryan *et al.*, 2007). Certas bactérias patogénicas têm a capacidade de sobreviver e de se multiplicar neste tipo de legume devido à disponibilidade de nutrientes nas folhas, as quais não possuem barreira física, como no caso dos frutos, sendo mais fácil a proliferação microbiana. Desta forma foi já relatada a presença de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em saladas mistas e em alface pronta a comer (Sagoo *et al.*, 2003; Abadias *et al.*, 2008; Carrasco *et al.*, 2008). *Escherichia coli* O157:H7 tem sido também associada a surtos de infeções alimentares por consumo do mesmo vegetal (Altekruse *et al.*, 1997). A contaminação pode ocorrer durante o crescimento e maturação no solo (já que o legume cresce em contacto com a terra), assim como na colheita, manuseamento e distribuição. Alguns investigadores demonstraram que as bactérias referidas têm capacidade de sobreviver por longos períodos de

tempo no estrume animal e em solos estrumados (Franz *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2006), o que aumenta a probabilidade de contaminação.

A qualidade e validade da alface são influenciadas pela desidratação. Quando os vegetais são armazenados abaixo da humidade relativa recomendada (95 % a 98 %), o teor em humidade no produto baixa e aumenta a taxa de transpiração, reduzindo o teor em água nos tecidos. Apesar disso, a humidade relativa nem sempre é controlada, mantendo-os na maioria dos casos a níveis bastante inferiores ao recomendado. No entanto, segundo estudos realizados (Agüero *et al.*, 2011), esta condição física tem um baixo impacto nos índices microbianos encontrados no produto, sendo as diferenças pouco significativas e permitindo a sua multiplicação sem dificuldade. A temperatura de refrigeração no local de armazenamento é outro factor importante, que retarda a deterioração dos alimentos, aumentando o tempo de vida dos legumes (Agüero *et al.*, 2011).

### **Microrganismos Contaminantes**

Os produtos hortofrutícolas podem ser contaminados por diversos tipos de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus ou protozoários (De Roever, 1998). Muitos fazem parte da microflora nativa dos locais onde estes alimentos se desenvolvem. Os vírus que causam infeções alimentares são de origem entérica, sendo transmitidos por ingestão de água ou alimentos contaminados e por contacto de pessoa a pessoa. Na maior parte dos casos, as gastroenterites não são graves e duram pouco tempo. O Norovírus e o vírus da Hepatite A são os agentes etiológicos deste grupo mais documentados quanto a infeções alimentares (Anónimo, 2002).

Os protozoários mais frequentemente associados a surtos de infeções alimentares nos frutos são *Cryptosporidium parvum*, *Giardia* sp. e *Cyclospora cayetanensis*. A contaminação por parte destes parasitas está essencialmente relacionada com uso de água sem tratamento na produção hortofrutícola, sendo possível provir também dos próprios manipuladores. Normalmente provocam diarreias, agudas ou crónicas, que permanecem apenas alguns dias ou duram meses (Jaykus, 1997; Anónimo, 2002). Os vírus e os parasitas estão presentes em baixas concentrações e não se multiplicam no alimento. Usam-no apenas como meio de transporte para alcançarem o hospedeiro (Jaykus, 1997). A pesquisa destes organismos em frutos e vegetais é rara, maioritariamente devido à falta de sensibilidade dos métodos de análise utilizados nestes produtos (Beuchat, 1998; Anónimo, 2002).

Muitas espécies de fungos, frequentemente encontradas no meio ambiente (água, solo, ar), podem multiplicar-se nos produtos hortofrutícolas, como *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. e *Phytophthora* spp. (este último muito associado à podridão do ananás) (Bartholomew *et al.*, 2003). A contaminação fúngica é notória, provocando alterações organolépticas como aparência desagradável (Cordenunsi *et al.*, 2003). O grande problema de segurança alimentar associado a este tipo de microrganismos é a produção de micotoxinas (aflotoxinas, ocratoxina A, patulina, etc.), metabólitos secundários derivados do crescimento de algumas espécies de fungos nos produtos agrícolas, podendo permanecer mesmo quando o micélio fúngico é removido. O risco de intoxicação centra-se no consumo da parte intacta do produto que, por migração, pode conter estes compostos. As micotoxinas têm estruturas químicas diferentes conforme o fungo produtor, provocando efemeridades no organismo, por ingestão de grandes quantidades ou ingestão continuada, como carcinogénese, nefrotoxía ou imunossupressão (Orriss, 1997; Drusch e Ragab, 2003; Andersen e Thrane, 2006).

As bactérias são transportadas nas cascas ou superfície dos vegetais e, no processo de descasque dos frutos, transferidas para a parte interna, conseguindo multiplicar-se ao encontrarem condições óptimas. Têm a capacidade de utilizar uma grande diversidade de substratos e possuem uma elevada velocidade de crescimento. Em condições ideais, podem apresentar tempos de geração de 20 minutos, levando à sua rápida multiplicação num curto período de tempo. No entanto, a velocidade de crescimento não é constante, já que os factores extrínsecos têm aqui influência. Mesmo assim, a sua rápida multiplicação faz com que sejam, na maioria das situações, os microrganismos numericamente predominantes nos alimentos (Anónimo, 2002). Desta forma, e como geralmente os produtos hortofrutícolas são consumidos em pouco tempo após serem adquiridos, devido ao curto tempo em que se mantêm frescos, as bactérias patogénicas têm neste estudo um maior destaque.

A grande preocupação centra-se a nível das bactérias patogénicas provenientes da contaminação fecal dos solos e águas residuais. Além disso, a lavagem destes alimentos com água não tratada e mesmo a higiene pessoal dos manipuladores (desde trabalhadores do campo a vendedores no mercado), contribuem significativamente para disseminar microrganismos patogénicos. Assim, a pesquisa dos grupos de bactérias que se seguem na superfície de vegetais e cascas de frutos pode auxiliar na recolha de informação sobre o tipo de práticas agrícolas e produção, como forma de avaliar se estes produtos ingeridos crus podem ou não constituir um risco para a segurança alimentar dos consumidores.

## **Família *Enterobacteriaceae***

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por diversas espécies de bactérias, umas patogénicas e outras inofensivas para o ser humano. Muitas fazem parte da microflora do tracto intestinal dos vertebrados, aparecendo por isso nas fezes dos animais, solo, água e plantas. Algumas têm a capacidade de constituir um risco para a saúde do consumidor, causando severas gastroenterites quando ingeridas nos alimentos, como o caso de certas estirpes de *E. coli* e *Salmonella* spp. (Schierack *et al.*, 2007). Contudo, esta família contém vários géneros de origem não necessariamente fecal, como *Erwinia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, encontradas no meio ambiente. Assim sendo, em microbiologia alimentar, é muito comum proceder-se à contagem de *Enterobacteriaceae* em alimentos processados, como indicador de higiene, de utilização de tratamentos inadequados ou de contaminação pós-processamento, permitindo inferir mais sobre a qualidade microbiológica do produto do que sobre contaminação fecal (Anónimo, 2005; Adams e Moss, 2008). Em produtos hortofrutícolas não processados pode ser uma mais-valia, indicando a qualidade das práticas agrícolas exercidas sobre os alimentos.

## ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* faz parte da microflora normal do trato intestinal de animais e seres humanos. A sua pesquisa em alimentos e águas deve-se ao facto de ser utilizado como o principal indicador de contaminação fecal. Existem estirpes que, devido à aquisição de factores de virulência, como certos mecanismos de adesão às células e produção de toxinas, são patogénicas. Normalmente dividem-se em 5 grupos: enterotoxigénica (ETEC), enteropatogénica (EPEC), enteroivasiva (EIEC), enteroagregativa (EA<sub>g</sub>gEC) e enterohemorrágica (EHEC). As ETEC produzem enterotoxinas e estão associadas a diarreias em crianças e viajantes, em países em desenvolvimento. Nos viajantes a causa baseia-se na ingestão de alimentos e água com padrões de higiene diferentes dos seus próprios países. O consumo de vegetais crus está relacionado com infecções provocadas por estas estirpes (Sussman, 1997; Beuchat, 1998). As EPEC não produzem enterotoxinas, mas causam diarreia em bebés em países desenvolvidos e gastroenterites em ambientes hospitalares (Anónimo, 2002). As EIEC levam a infecções tipo disenterias, enquanto que as EA<sub>g</sub>gEC podem levar a diarreias crónicas. As EHEC conduzem a situações mais graves devido à produção de

verotoxinas, ocorrendo diarreias severas, acompanhadas de dores abdominais e sangramento. Alguns pacientes, principalmente crianças, desenvolvem síndrome hemolítico urémico que se caracteriza por um tipo de anemia, associado a problemas da função renal e anomalias do sistema nervoso central, resultando em sequelas graves. O serótipo mais comum é *E. coli* O157:H7 (Sussman, 1997).

*E. coli* O157:H7, produtora da toxina Shiga, é reconhecida como uma bactéria patogénica importante causadora de infecções alimentares (Tauxe, 1997; Rangel *et al.*, 2005). É maioritariamente encontrada em produtos lácteos e carnes; o gado bovino é considerado o seu principal reservatório. Contudo, têm sido também documentados surtos provocados pelo consumo de vegetais e frutos, como o caso de alfaces (Rangel *et al.*, 2005; Delaquis *et al.*, 2007), melões e melancias (delRosario e Beuchat, 1995; Rangel *et al.*, 2005). Outro serótipo do grupo EHEC, também produtor da toxina Shiga, *E. coli* O104:H4, foi recentemente associado a um surto de infecção alimentar na Europa, devido ao consumo de rebentos vegetais crus contaminados de origem alemã (Anónimo, 2011).

A incidência de infecções gastrointestinais originadas por *E. coli* depende de vários factores, incluindo o tipo de higiene no processamento alimentar. Certas estirpes conseguem causar doença com uma dose infecciosa muito baixa, consoante o estado do sistema imunitário do paciente. Os casos fatais são raros, tendo maior frequência em crianças (Sussman, 1997). Segundo estudos realizados desde a década de 90, nos Estados Unidos da América, a incidência destas infecções tem diminuído, principalmente as provocadas por *E. coli* O157:H7 (Pommerville, 2006; CDC, 2007a).

### ***Salmonella* spp.**

*Salmonella* spp. estão intimamente relacionadas com *E. coli*: pertencem à mesma família e também se encontram no tracto intestinal de muitos animais e humanos. Assim, surgem nas fezes, solo e água. O género *Salmonella* está dividido em três espécies, *S. bongori*, *S. subterranea*, *S. enterica*, e subdividido em diversas subespécies. Muitos serótipos pertencentes a estas subespécies têm sido identificados. Esses serótipos são determinados de acordo com o tipo de antígenos: somático (O), capsular (Vi) e flagelar (H) (Hui *et al.*, 2001).

As estirpes *S. enterica* subsp. *enterica* serótipo Enteritidis e *S. enterica* subsp. *enterica* serótipo Typhimurium são as mais frequentemente documentadas como sendo causadoras de infecções alimentares. Aparecem regularmente em água contaminada e alimentos consumidos

crus, como marisco, carne e derivados, ovos, produtos lácteos e mesmo saladas. A infecção causada denomina-se por salmonelose e caracteriza-se por ser uma gastroenterite aguda, com sintomas como diarreia, vômitos, febre, dores abdominais e de cabeça. Embora seja auto-limitada e de curta duração, uma pequena proporção da população infectada pode desenvolver bacterémia, sendo os casos fatais muito raros (Anónimo, 2002).

A ocorrência de *Salmonella* spp. em frutos foi já documentada, nomeadamente meloas, melões e melancias (Blostein, 1991; Golden *et al.*, 1993; Tauxe, 1997). Além disso, tem a capacidade de ser transportada ou mesmo crescer na casca de alguns frutos, como no caso de dióspiros (Rezende *et al.*, 2009), tornando imperativas as boas práticas de higiene para quem manipula este tipo de alimentos.

Toda a população é susceptível a estas infecções, contudo, a severidade da doença depende do serótipo da bactéria, da idade e da saúde do consumidor. Crianças, idosos e imunocomprometidos tornam-se alvos privilegiados. A dose infecciosa é normalmente baixa, mas depende do indivíduo em questão (Hui *et al.*, 2001). Segundo estudos realizados desde a década de 90, nos Estados Unidos da América, a incidência das salmoneloses tem sido constante ao longo dos anos (Pommerville, 2006; CDC, 2007a).

Os terrenos agrícolas, que não estiveram em contacto com animais ou fertilizantes orgânicos de origem animal, normalmente não são portadores das espécies anteriormente descritas. Contudo, outros organismos patogénicos presentes nesses locais são muitas vezes encontrados em produtos hortofrutícolas. É o caso de *L. monocytogenes*, considerada como ambientalmente ubíqua (De Roever, 1998).

### ***Listeria monocytogenes***

*L. monocytogenes* é uma bactéria ubíqua, estando presente em todo o lado, desde água e solo livres de contaminação fecal, a locais com acesso a esgotos e estrume animal; pode ser também encontrada no tracto intestinal de muitos animais, incluindo humanos. Além disso, é um organismo saprófita, que participa na decomposição da matéria orgânica vegetal (Beuchat, 1998). Mediante estes factos, é possível verificar a sua presença em frutos e vegetais crus. Entre 2000 e 2005 foi realizado, no Chile, um estudo em saladas de vegetais crus, prontas a consumir, vendidas em vários supermercados, onde 15,3% das saladas analisadas continham *L. monocytogenes* (Cordano e Jacquet, 2009). A sua sobrevivência em frutos como melão,



melancia, papaia e dióspiros foi já documentada (Penteado e Leitão, 2004; Uchima *et al.*, 2008). Recentemente ocorreu um surto de listeriose nos Estados Unidos da América devido ao consumo de meloas contaminadas, oriundas do Estado do Colorado nos Estados Unidos da América (CDC, 2011).

O patógeno é responsável por casos esporádicos e surtos de listeriose, uma infecção normalmente contraída pela ingestão de alimentos contaminados. A sintomatologia inclui principalmente febre, dores musculares, náuseas e por vezes diarreia, sendo a sua duração variável. Nos grupos de risco (grávidas e os seus fetos, recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos) é documentada uma elevada taxa de mortalidade, a rondar os 30 % (Beuchat, 1998; Gram, 2004). Nas grávidas os sintomas são semelhantes aos de uma gripe, podendo levar à morte do feto ou a parto prematuro. No resto da população referida há a possibilidade de ocorrer bacterémia e/ou meningite ou outras infecções do sistema nervoso central (Beuchat, 1998; Anónimo, 2002).

*L. monocytogenes* tem a capacidade de crescer a temperaturas baixas ( $\approx 2$  °C), multiplicando-se consideravelmente em alimentos armazenados em refrigeração por um longo período de tempo, antes do consumo (Beuchat, 1998). O seu desenvolvimento é também possível em ambientes com valores de pH a rondar os 4,2 (Gram, 2004; WHO/FAO, 2004), o que permite a sua propagação em quase todos os frutos, nomeadamente os ácidos, como o caso do ananás com pH entre 3,3 e 5,2 (FDA, 2009).

A listeriose é frequentemente associada a alimentos prontos a comer, crus ou minimamente processados (vegetais, derivados de carne como os enchidos, produtos lácteos que não sofreram pasteurização), marisco e produtos refrigerados com um prazo de validade extenso. A doença surge por vezes ligada a surtos, mas muitos casos ocorrem esporadicamente (Gram, 2004). Tem uma incidência superior em países industrializados, embora seja rara (documentos revelam 0,1 a 11,3 casos em 1 milhão de pessoas por ano). A frequência de exposição ao patógeno é superior à incidência de listeriose, o que se justifica com a ingestão de uma reduzida dose infecciosa por parte do segmento não imunocomprometido da população, não conduzindo a qualquer sintomatologia (Jones e MacGowan, 1995; WHO/FAO, 2004). A dose mínima infecciosa é difícil de determinar devido à falta de bons modelos animais (Gram, 2004).

## ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria patogénica oportunista presente nas fossas nasais e na pele de muitos indivíduos saudáveis (Hayward *et al.*, 2008). A contaminação dos géneros alimentícios é, por isso, muitas vezes despoletada pelo contacto com as mãos de manipuladores de alimentos portadores do microrganismo. O facto de ter a capacidade de crescer numa vasta gama de temperaturas (7 a 48,5 °C) e pH baixo ( $\approx$  4,2), permite o seu desenvolvimento e produção dos respectivos metabolitos tóxicos em muitos alimentos, como carne e derivados, leite e derivados, e também em produtos hortofrutícolas (Le Loir *et al.*, 2003). Entre 1989 e 1990, este organismo foi isolado de saladas verdes prontas a comer, preparadas na cozinha de um hospital em Londres (Houang *et al.*, 1991). Foi também detectado em alfaces prontas a comer em Espanha (Soriano *et al.*, 2001) e em amostras de sumos de vários frutos na Líbia (Ghenghesh *et al.*, 2005).

Muitas espécies de *Staphylococcus*, incluindo coagulase negativas e coagulase positivas, têm a capacidade de produzir enterotoxinas. Contudo, a grande maioria das gastroenterites estafilocócicas são atribuídas a *S. aureus*. Esta espécie, coagulase positiva, é a causa de muitas intoxicações alimentares devido à produção de múltiplas enterotoxinas (A, B, C, D, E, entre outras) (Montville e Matthews, 2008). As toxinas são termoestáveis, tendo sido demonstrado que a sua inactivação parcial ou completa ocorre a temperaturas a rondar os 100 °C durante 10 minutos (Schwabe *et al.*, 1990), não sendo destruídas pela cozedura dos alimentos. Quando acontece a intoxicação alimentar, esta é de curta duração, mas nalguns casos severa, dependendo da quantidade de toxina ingerida, do estado de saúde do paciente e da resposta do seu organismo. A sintomatologia inclui náuseas, vómitos, diarreia, dores abdominais, de cabeça e musculares e cansaço (Le Loir *et al.*, 2003). Todavia, *S. aureus* enterotoxigénico não compete bem com a vasta flora bacteriana existente nos frutos e vegetais consumidos crus. Assim, altas concentrações de células e consequente produção da toxina são raramente observadas neste tipo de produtos (Beuchat, 1998).

Considera-se que a qualidade microbiológica dos produtos hortofrutícolas depende primariamente da contaminação inicial (representada pelos microrganismos inicialmente presentes, provenientes das condições pré-colheita) e, posteriormente, da intensa manipulação e contacto com diversas superfícies durante a colheita, transporte, armazenamento e comercialização (De Roever, 1998; Anónimo, 2002).

Neste contexto, este trabalho teve como objectivo principal avaliar a presença de bactérias potencialmente patogénicas nas cascas rugosas, repletas de inúmeras reentrâncias, de ananases e meloas comercializados em Portugal e a qualidade microbiológica de alfaces portuguesas, analisando a variedade, origem e locais de distribuição dos produtos hortofrutícolas, assim como a época do ano em que foram adquiridos.

## Material e Métodos

### Produtos Analisados

Entre Junho de 2009 e Junho de 2010, foram recolhidas 120 amostras de produtos hortofrutícolas (40 alfaces, 40 ananases, 40 meloas), de diversas origens geográficas, em vários tipos de estabelecimentos comerciais localizados no Norte de Portugal e, nalguns casos, retiradas do próprio local de cultivo. Analisaram-se duas variedades de alfaces, lisas (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) e frisadas (*Lactuca sativa* L. var. *crispa*), dois tipos de frutos para os ananases, Ananás dos Açores e abacaxis de origem internacional (ambos pertencentes à espécie *Ananas comosus* L. Merrill) e duas variedades de meloa, Cantaloupe (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* Naudin) e Gália (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naudin). Depois de adquiridos e sem lavagem prévia, descascaram-se os frutos e guardaram-se as cascas em caixas plásticas de armazenamento de alimentos limpas e devidamente secas. As amostras foram armazenadas durante uma noite a 4 °C antes de serem analisadas. As folhas das alfaces foram analisadas directamente sem qualquer tratamento, sendo retirada uma mistura de folhas da parte externa e interna dos vegetais.

### Caracterização Microbiológica das Amostras

Adicionaram-se 25 g de cada amostra (folhas de alface ou casca da fruta seleccionada) a 225 mL de BPW (Buffered Peptone Water, Biokar Diagnostics, França) e a 225 mL de Half Frazer Broth (Biokar Diagnostics), sendo de seguida homogeneizados num *stomacher* (BagMixer 400, Interscience, França) durante 60 segundos. Prepararam-se diluições decimais em solução de Ringer (Biokar Diagnostics) a partir do homogeneizado em BPW para a contagem de microrganismos: totais em PCA (Plate Count Agar, Pronadisa, Espanha) com incubação a 30 °C durante 72 horas (ISO 4833, 2003), *E. coli* em TBX (Tryptone Bile X-glucuronide Agar, BioRad, USA) com incubação a 44 °C durante 24 horas (ISO 16649-2, 2001), *Enterobacteriaceae* em VRBG (Violet Red Bile Glucose, Merck, Alemanha), com incubação a 37 °C durante 24 horas, de acordo com a ISO 21528-2 (2004a) e também contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva. Para este último procedeu-se à inoculação em BPA (Baird-Parker Agar, Pronadisa, Espanha) com gema de ovo e solução de telurito de potássio (Sigma Aldrich, Alemanha), seguida de incubação a 37 °C durante 48 horas. Para as

colónias características e algumas não características foi testada a presença da enzima coagulase (Biokar Diagnostics) (ISO 6888-1, 1999). Os isolados coagulase positiva foram transferidos para MSA (Manitol Salt Agar, Merck), sendo de seguida testados por coloração de Gram, oxidase e catalase. Ainda a partir da “solução mãe” em BPW, realizou-se a pesquisa de *Salmonella* spp. segundo a norma ISO 6579 (2002). A solução com Half Frazer Broth foi utilizada para a detecção de *Listeria monocytogenes* pelo método VIDAS (AFNOR, 2002), o qual se baseia na tecnologia ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), que utiliza anticorpos específicos para esta espécie. A confirmação das amostras positivas para a pesquisa de *L. monocytogenes* foi baseada na norma ISO 11290-1(2004b).

Todas as bactérias isoladas foram conservadas a -20 °C, em TSB (Tryptic Soy Agar, Pronadisa) com 30 % de glicerol (v/v) (Panreac, Espanha).

## **Caracterização das estirpes isoladas**

### ***Staphylococcus* coagulase positiva**

Extracção de DNA: A extracção de DNA dos isolados *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada utilizando o método descrito por Aires de Sousa *et al.* (1996) com alteração do tempo de incubação com lisostafina (solução com 200 µg/mL, Sigma Aldrich) para *over-night* a 37 °C. O método baseia-se na lise da parede celular pela acção da lisostafina, rementamento da célula por Guanidina Isotiocianato 4 M (Sigma Aldrich) e imobilização e purificação do DNA através de uma suspensão de Celite com 0,2 g/mL (Fluka, USA). Foram feitas lavagens sucessivas do precipitado (após agitação e centrifugação a 14000 rpm) com álcool a 70 % (Panreac, Espanha) e acetona a 99,5 % (Valente & Ribeiro, Portugal). O DNA foi eluído da celite por adição de Tris-HCl 10 mM (1,2 g/L Tris (BioRad) e pH ajustado a 8,0 com HCl 0,1 N (Panreac)) e incubação a 56 °C durante 10 minutos. Após uma ultima centrifugação (10000 rpm) o sobrenadante com DNA foi recolhido e armazenado a -20 °C. De seguida efectuou-se a quantificação do mesmo pela medição da absorvância de cada uma das amostras a três comprimentos de onda: 260 nm, 280 nm e 320 nm. Foi utilizada uma *cuvette* em quartzo de fundo reduzido (Hellma, Alemanha). A concentração de DNA foi calculada pela fórmula:

$$C (\mu\text{g/mL}) = (\text{Leitura Abs}_{260} - \text{Leitura Abs}_{320}) \times \text{Factor Diluição} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

Assume-se que Abs<sub>260</sub> de 1,0 = 50 µg/mL de DNA puro. A leitura da Abs<sub>320</sub> deve estar muito próxima de zero (0±0,005) (Hu *et al.*, 2008). A pureza de DNA na amostra é determinada pela razão Abs<sub>260</sub>/ Abs<sub>280</sub> (Stoeppler *et al.*, 2004; Leadbetter, 2005).

**PCR Multiplex:** Partiu-se de amostras de DNA com uma concentração de 16 µg/mL e realizou-se um PCR, baseado no método descrito Zhang *et al.* (2004), para avaliar a presença dos genes 16S rRNA (gene específico do género *Staphylococcus*), *nuc* (gene específico da espécie *S. aureus*) e *mecA* (gene determinante da resistência à meticilina) (Tabela 1). Como controlos incluíram-se as estirpes *S. aureus* ATCC 29213 (que possui os genes 16S rRNA e *nuc*), *S. aureus* DSM 11729 (que possui os genes 16S rRNA, *nuc* e *mecA*) e *S. epidermidis* DSM 20044 (que possui o 16S rRNA). Na mistura de 25 µL para o PCR, utilizou-se uma concentração de 0,2 µM de cada *primer* (Stab Vida, Portugal), 5 mM KCl (Fermentas Life Science, Alemanha), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas Life Science), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (Bioron, Alemanha), 1 U/µL de Taq polimerase (Stab Vida) e 5 µL do produto da extracção de DNA com concentração de 16 µg/mL, sendo as condições de PCR as descritas na tabela 1. Para a electroforese preparou-se um gel com 1,5 % de LE Agarose (SeaKem, USA) em tampão TAE (48,4 g/L Tris, 6,8 g/L Acetato de sódio anidro (Sigma Aldrich), 3,7 g/L EDTA (Panreac) e pH ajustado a 8,0 com Ácido acético glacial (Panreac)), tendo sido corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL (Sigma Aldrich). A observação do gel foi efectuada num transiluminador UV com captura de imagem (Gel Doc 2000, BioRad).

**Tabela 1.** Sequência de *primers* usados no PCR Multiplex para *S. aureus*, tamanho dos fragmentos e condições de PCR segundo o método de Zhang *et al.* (2004)

<i>Primers</i>	Sequencias	Condições PCR
<b>16S rRNA</b> (756 pb)	Staph756F 5'-AAC TCT GTT ATT AGG GAA GAA CA-3'	94 °C 5 min.
	Staph 750R 5'-CCA CCT TCC TCC GGT TTG TCA CC-3'	94 °C 40 s
<i>nuc</i> (279 pb)	Nuc1 5'-GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT-3'	58 °C 40 s
	Nuc2 5'-AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC-3'	72 °C 1 min. (10 ciclos)
<i>mecA</i> (310 pb)	MecA1 5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3'	94 °C 1 min.
	MecA2 5'- CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A-3'	50 °C 1 min. 72 °C 2 min. (25 ciclos)
		72 °C 10 min.

Susceptibilidade a Agentes Antimicrobianos: A concentração mínima inibitória (CMI) ( $\mu\text{g/mL}$ ) de vários antibióticos foi determinada para os isolados *Staphylococcus coagulase* positiva, pelo método de diluição em agar de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). Os antibióticos testados foram: ampicilina, penicilina G, oxacilina, vancomicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, rifampicina e tetraciclina (Sigma Aldrich), com concentrações no intervalo de 0,125 a 512  $\mu\text{g/mL}$ . A experiência foi realizada com os meios de cultura MH (Mueller-Hinton Agar, bioMérieux, França) com ajuste de catiões ( $\text{CaCl}_2$  (Sigma Aldrich) e  $\text{MgCl}_2$  (Merck)) para a ampicilina e penicilina G, MH com 4 % de NaCl (Panreac) para a oxacilina e MH sem aditivos para os restantes antibióticos. Como controlo de qualidade do método utilizaram-se as estirpes *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213. Uma colónia de cada estirpe crescida *over-night* a 37 °C em TSA (Trypticase Soy Agar, Pronadisa) foi seleccionada e a turbidez da suspensão celular em solução de Ringer foi ajustada ao padrão 0,5 McFarland, aproximadamente. Incubaram-se os meios de cultura, com as diferentes concentrações dos diversos antibióticos, com 1  $\mu\text{L}$  da suspensão celular, em duplicado, a 37 °C durante 24 horas. A classificação de isolados de acordo com a sua susceptibilidade (sensível, intermédio ou resistente) a cada um dos antibióticos baseou-se nos valores recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007).

### ***Listeria monocytogenes***

Extracção de DNA: A extracção de DNA foi realizada segundo o método descrito por Doumith *et al.* (2004), pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de tampão de Lise (0,25 % dodecil sulfato de sódio (BioRad) – 0,05 N NaOH (Pronalab, Portugal)) às colónias e incubação a 99 °C durante 15 minutos. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de água ultra-pura estéril e armazenaram-se os *eppendorfs* com DNA a -20 °C.

PCR Multiplex: 5  $\mu\text{L}$  do produto da extracção de DNA foi utilizado para a realização do PCR pelo método de Doumith e seus colaboradores (2004) para avaliação do serótipo das estirpes isoladas. Desta forma, a amplificação do gene *prs* permitiu confirmar o género das bactérias e os fragmentos *lmo0737*, *lmo1118*, ORF2819 e ORF2110 permitiram a separação das estirpes por serótipos (Tabela 2). Como controlos incluíram-se as estirpes *L. monocytogenes* NCTC 11994 (correspondente ao serótipo 4b), *L. monocytogenes* CECT 911 (serótipo 1/2c), *L.*

*monocytogenes* CECT 936 (serótipo 1/2b) e *L. monocytogenes* CIP 104794 (serótipo 1/2a). Na mistura de 25 µL para o PCR, utilizaram-se concentrações de 0,2 µM de *prs*, 1,5 µM de *lmo1118*, 1 µM de *lmo0737*, ORF2819 e ORF2110 (Metabion, Alemanha), 5 mM Taq *buffer* (Fermentas Life Science), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas Life Science), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (Fermentas Life Science), 0,5 U/µL de Taq polimerase (Fermentas Life Science) e 5 µL do produto da extração de DNA, sendo as condições do ciclo as mesmas descritas no método citado (Tabela 2). Para a electroforese, o gel continha 2 % de LE Agarose em tampão TAE, tendo sido corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL. A observação do gel foi efectuada num transiluminador UV com captura de imagem (Gel Doc 2000).

**Tabela 2.** Sequência de *primers* usados no PCR Multiplex, tamanho dos fragmentos, serótipos correspondentes a cada fragmento e condições de PCR segundo o método de Doumith *et al.* (2004)

<i>Primers</i>	Sequencias	Serótipos correspondentes	Condições PCR
<i>lmo0737</i> (691 pb)	F 5'-AGG GCT TCA AGG ACT TAC CC-3' R 5'-ACG ATT TCT GCT TGC CAT TC -3'	1/2a, 1/2c, 3a e 3c	
<i>lmo1118</i> (906 pb)	F 5'-AGG GGT CTT AAA TCC TGG AA -3' R 5'-CGG CTT GTT CGG CAT ACT TA -3'	1/2c e 3c	94 °C 3 min.
<b>ORF2819</b> (471 pb)	F 5'-AGC AAA ATG CCA AAA CTC GT -3' R 5'-CAT CAC TAA AGC CTC CCA TTG -3'	1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e	94 °C 24 s 53 °C 69 s 72 °C 69 s (35 ciclos)
<b>ORF2110</b> (597)	F 5'-AGT GGA CAA TTG ATT GGT GAA -3' R 5'-CAT CCA TCC CTT ACT TTG GAC -3'	4b, 4d e 4e	72 °C 7 min.
<i>prs</i> (370 pb)	F 5'-GCT GAA GAG ATT GCG AAA GAA G -3' R 5'-CAA AGA AAC CTT GGA TTT GCG G -3'	Todas as espécies de <i>Listeria</i>	

Susceptibilidade a Agentes Antimicrobianos: A concentração mínima inibitória (CMI) (µg/mL) de vários antibióticos foi determinada para todas as estirpes de *L. monocytogenes* isoladas, pelo método de diluição em agar de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007). Os antibióticos foram seleccionados de acordo com outros autores (Hof, 1991; Jones e MacGowan, 1995; Aureli *et al.*, 2003; Conter *et al.*, 2009; Almeida, 2010): ampicilina, penicilina G, vancomicina cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, estreptomina, nitrofurantoína, rifampicina e tetraciclina (Sigma Aldrich). A experiência foi realizada de acordo com o descrito anteriormente para os isolados de



*Staphylococcus* coagulase positiva. Para o antibiótico Trimetoprim-Sulfametoxazole foi utilizada a técnica de  $\epsilon$ -teste (Biodisk, bioMérieux, Suécia), um método quantitativo que permite a determinação da CMI através de uma tira impregnada com diferentes concentrações do antibiótico referido entre 0,002 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , em meio MH por espalhamento com zaragatoa. Foi realizado igualmente em duplicado e a incubação igual aos restantes antibióticos. Como controlo incluiu-se *E. coli* ATCC 25922.

### **Análise Estatística**

Realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com um factor para verificar se haveria diferenças significativas nas contagens bacterianas das diferentes variáveis dos produtos hortofrutícolas analisados. Estudaram-se as diferenças entre a variedade das amostras, a distribuição (hipermercados, supermercados, pequeno retalho ou adquiridas directamente do campo de cultivo), o país de origem (no caso dos frutos) e a época do ano em que foram adquiridas. Os cálculos foram efectuados usando a aplicação *Analysis ToolPak* do *Microsoft Office Excel* 2010.

## Resultados e Discussão

### Caracterização Microbiológica das Amostras

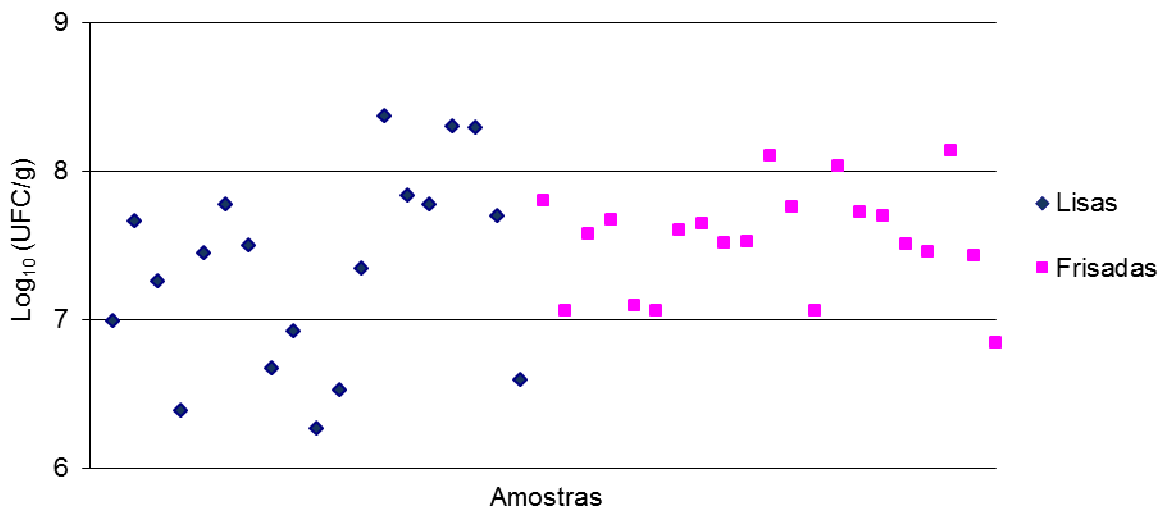
#### Alface

Num período de um ano foram analisadas 40 alfaces de origem portuguesa, adquiridas em diversos locais situados no Grande Porto. Algumas foram retiradas directamente do local de cultivo (campo), mas a maioria foi adquirida em hipermercados, supermercados ou pequeno retalho (mercearias, frutarias, feiras). A comparação da qualidade microbiologia das amostras foi efectuada com base na contagem de microrganismos totais, contagem de *E. coli*, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g), pesquisa de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, contando com as seguintes variáveis: variedade (alface lisa ou frisada), o local de recolha das amostras e a época do ano em que foram adquiridas.

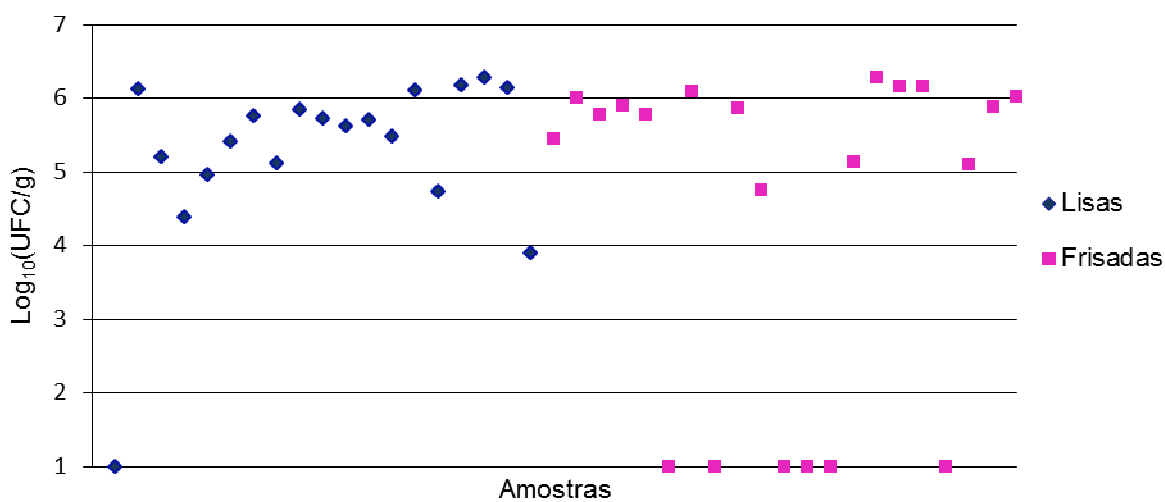
A primeira variável apresentada é a variedade. As alfaces comparadas pertenciam à espécie *Lactuca sativa* L., diferenciando apenas na variedade: a alface lisa é cientificamente designada por *Lactuca sativa* L. var. *capitata* e conhecida na gíria como alface-repolhuda, a alface frisada é designada por *Lactuca sativa* L. var. *crispa* (Anónimo, 2000b; Lopes e Simões, 2006), representadas na figura 1. A contagem de microrganismos totais, a contagem de *Enterobacteriaceae* e de *E. coli*, em relação à variedade, são apresentadas nas figuras 2, 3 e 4, respectivamente.



**Figura 1.** Representação das duas variedades de alface analisadas. **A** - Alface lisa (De: <http://www.gaertnerrei-willmann.de/produktdetails/items/kopfsalat.html>; Acedido em: 5 de Novembro de 2011); **B** - Alface frisada (De: <http://www.montedolaranjal.com/pt-pt/tag/alface-frisada/>; Acedido em: 5 de Outubro de 2011).



**Figura 2.** Contagem de microrganismos totais em alfaces lisas e frisadas. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.



**Figura 3.** Contagem de *Enterobacteriaceae* em alfaces lisas e frisadas. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.





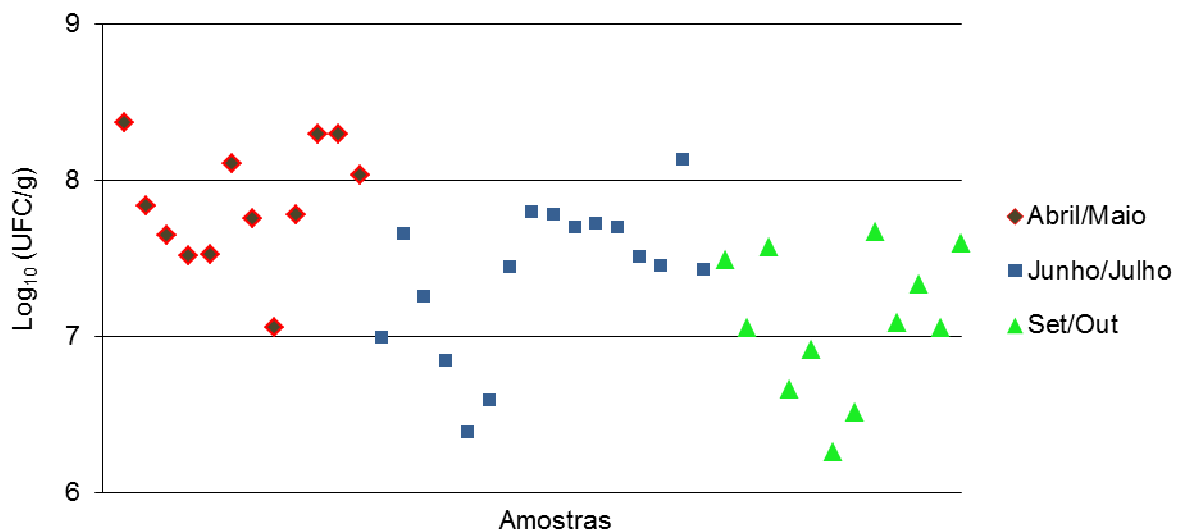


registos das datas das fertilizações do solo, aplicações de pesticidas (para verificar se são respeitados os intervalos de segurança), de acordo com o método de produção integrada (Lopes e Simões, 2006). Cada vez mais, os grandes distribuidores pedem aos seus produtores que embalem as alfaces em plásticos finos mas abertos (para permitir a respiração das folhas), de forma a minimizar a manipulação dos produtos após colheita. Se possível, o produtor lava e embala a alface imediatamente após a colheita. Até ao transporte e durante o mesmo, são obrigatórias temperaturas de refrigeração (Anónimo, 2000b). No caso do pequeno retalho, muitas destas exigências não se aplicam, já que na maioria dos casos os produtos são comprados no mercado abastecedor, sendo o percurso do legume desconhecido pelos distribuidores. Além disso, é nestas pequenas lojas que a cadeia do frio é repetidamente interrompida, permitindo a proliferação microbiana. Assim sendo, era esperado que as amostras adquiridas no pequeno retalho possuísse um maior número de microrganismos em comparação com os grandes distribuidores. As amostras pertencentes ao grupo “campo” foram recolhidas directamente no local de cultivo (hortas pequenas para consumo caseiro, sem controlo de fertilização ou de água de rega). Pela análise das figuras 5 e 6 e pelos testes estatísticos realizados, a contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae* das amostras não foram influenciadas significativamente ( $p > 0,050$ ) pelo local de aquisição. Provavelmente, a flora autóctone dos solos utilizados é muito semelhante entre todos os produtores, com diferenças apenas na quantidade de adubos de origem animal adicionados, a qual influencia a contagem de *E. coli*, um indicador de contaminação fecal. As alfaces adquiridas em supermercados apresentaram contagens de *E. coli* significativamente mais baixas ( $p = 0,040$ ) do que as adquiridas nos outros tipos de estabelecimentos (Figura 7). Uma vez que, devido à constatação do facto com profissionais da área, os supermercados e os hipermercados impõem aos produtores requisitos de higiene e de segurança alimentares semelhantes, a diferença de resultados pode ser justificada pela reduzida dimensão da amostra analisada. Apesar de não existirem diferenças significativas entre as amostras do hipermercado, pequeno retalho e campo, os valores mais elevados do indicador de contaminação fecal (superior a  $10^3$  UFC/g) foram registados em alfaces do pequeno retalho e do campo. Neste último, não há qualquer controlo a nível da produção, visto ser para consumo particular, assim como no pequeno retalho, a qualificação de fornecedores não é normalmente exigida.

Quanto à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, apenas ocorreu em 3 amostras na ordem dos  $10^3$  UFC/g ( $\log_{10}=3$ ), uma em cada distribuidor (hipermercado, supermercado e campo), não sendo as diferenças significativas ( $p > 0,050$ ).

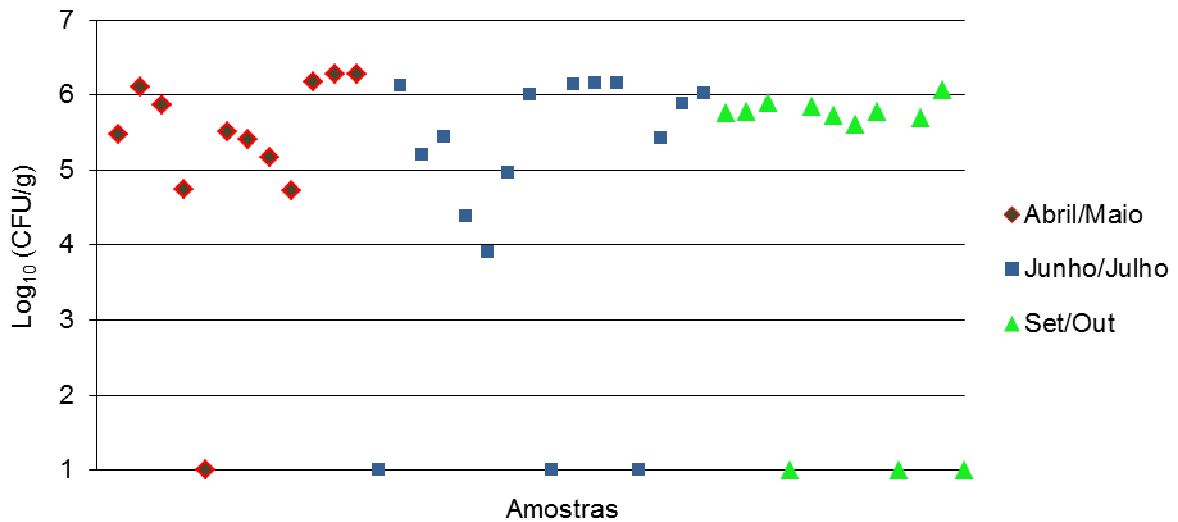
A pesquisa de *L. monocytogenes* foi positiva para 2 alfaces em cada um dos seguintes grupos: hipermercado, pequeno retalho e campo. No supermercado não foi encontrada a bactéria. Contudo, encontrar o patógeno nos locais habituais de compra para consumo doméstico pode constituir um risco para a saúde, já que o legume é consumido cru e, muitas vezes, sem nenhum tipo de tratamento além de uma pequena lavagem com água em casa. Esta lavagem pode reduzir a carga microbiana presente no alimento, mas não elimina todos os organismos patogênicos (Parish *et al.*, 2003; Rajvanshi, 2010). Ao colocar a alface contaminada no frigorífico e dado que *L. monocytogenes* consegue proliferar a temperaturas de refrigeração, aumenta o risco de contaminação do mesmo e de outros produtos alimentares nele armazenados, como demonstrado por outros autores (Sergelidis *et al.*, 1997; Azevedo *et al.*, 2005).

A época do ano foi outra variável estudada. As figuras 8, 9 e 10 mostram o resultado obtido para as contagens de microrganismos totais, de *Enterobacteriaceae* e de *E. coli*, em diferentes períodos do ano.

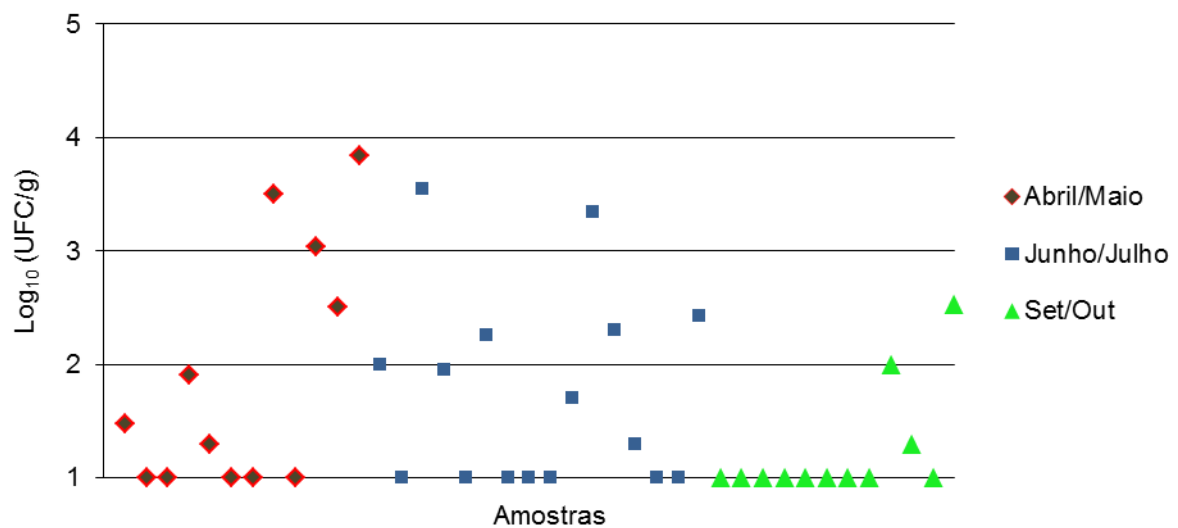


**Figura 8.** Contagem de microrganismos totais em alfaces adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.





**Figura 9.** Contagem de *Enterobacteriaceae* em alfaces adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.



**Figura 10.** Contagem de *E. coli* em alfaces adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.

A plantação de alface ocorre durante todo o ano, preferencialmente de Setembro a Abril, com colheita após 90 a 120 dias (plantações de inverno) e Março a Julho, colhidas após 60 a 75 dias (plantações de verão). A fertilização inclui a chamada adubação de fundo, realizada antes da instalação da cultura, após a devida análise do solo e, se necessário, a adubação de cobertura, no período inicial de desenvolvimento das plantas (Lopes e Simões, 2006). Pela análise das figuras 8, 9 e 10, e pelos testes estatísticos ( $p > 0,050$ ), não foram

observadas diferenças significativas nas várias épocas do ano para a contagem de microrganismos totais, de *Enterobacteriaceae* e de *E. coli*, respectivamente, indicando que a carga microbiana dos solos mantem-se estável ao longo do ano.

Quanto à contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, não são apresentadas diferenças significativas ( $p>0,050$ ), visto que ocorreram apenas em 3 amostras, na ordem dos  $10^3$  UFC/g ( $\log_{10}=3$ ), distribuídas pelas várias épocas do ano.

A pesquisa de *L. monocytogenes* só foi positiva em 6 amostras e nos meses de Junho/Julho. Isto levaria a inferir que é mais propício encontrar o patogénico nos meses mais quentes, contudo a afirmação não pode ser comprovada porque as amostras não pertencem todas ao mesmo produtor. Para tal, seria necessária uma continuidade na análise das alfaces oriundas do mesmo local em vários meses, o que não foi possível.

Em produção integrada, exige-se que as práticas agrícolas utilizadas garantam a protecção da qualidade da água, principalmente no que se refere à concentração de nitratos. Os adubos utilizados são também controlados, com atenção aos fertilizantes orgânicos (matérias de origem vegetal, animal ou mistura de ambas), no qual são feitas análises à qualidade química e microbiológica: não são admitidos valores superiores a  $10^3$  UFC/g de *E. coli* ou presença de *Salmonella* spp. em 25g de matéria orgânica (Portaria nº 631/2009). Assim, e como se prevê, por constatação do facto com profissionais da área, que a maioria das alfaces adquiridas tenham sido plantadas de acordo com produção integrada (com excepção de algumas amostras do campo para consumo caseiro), justifica-se a ausência de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas. As contagens de *E. coli* foram sempre abaixo de  $10^3$  UFC/g, excepto 4 amostras, duas pertencentes ao campo, no qual não há controlo, e outras duas do pequeno retalho (Figura 7).

### **Ananás**

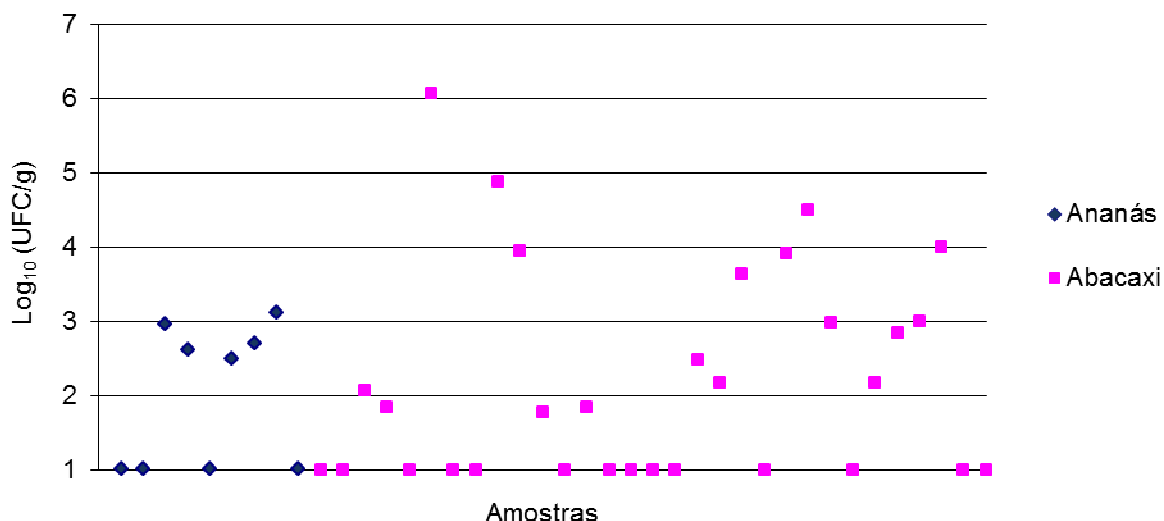
O ananás é dos frutos tropicais mais importantes ao nível da produção mundial (Bartholomew *et al.*, 2003). O fruto é, normalmente, consumido cru e não tem qualquer tipo de tratamento prévio pós colheita. Desta forma, tornou-se interessante analisar a sua carga microbiana, principalmente quando é possível comparar frutos portugueses (dos Açores) com outros oriundos de países em que as condições sanitárias utilizadas nos campos de cultivo poderão não ser as mesmas exigidas em países europeus.

Num período de um ano foram analisadas as cascas de 40 ananases/abacaxis de diversas origens, comprados em vários locais situados no Grande Porto. Fez-se a comparação da qualidade microbiológica das amostras através da contagem de microrganismos totais, de *E. coli*, de *Enterobacteriaceae* e de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g), pesquisa de *Salmonella* spp. e de *L. monocytogenes*, contando com várias variáveis: o tipo de fruto (ananás ou abacaxi), o local de distribuição, a origem e a época do ano em que foram adquiridas.

A primeira variável apresentada é o tipo de fruto. O ananás e o abacaxi pertencem à mesma espécie: *Ananas comosus* L. Merrill. Existem apenas cinco variedades desta espécie distribuídas a nível mundial. Portugal é dos poucos países que diferencia o fruto em duas designações diferentes, baseado na forma de cultivo e nas suas características organolépticas. O ananás dos Açores, cientificamente conhecido como *A. comosus* L. Merr. var. *comosus*, é oriundo da América do Sul, do tempo de Cristóvão Colombo (Bartholomew *et al.*, 2003), mas a sua produção em Portugal é praticada de forma diferente (em estufas de vidro e madeira, com solos orgânicos) o que lhe confere características únicas. A diferente prática de cultivo tornou-o uma referência mundial de qualidade e de Dominação de Origem Protegida (DOP) (CE, 1996). Sendo uma planta tropical, é sensível à geada e resiste bem ao tempo seco, preferindo regiões com temperaturas entre 21 °C a 32 °C. Pode ser cultivado em qualquer tipo de solo, desde que permeável e com pH entre 5,5 e 6,0. Os diversos tipos de solo, variação de temperaturas e modo de produção influenciam as grandes diferenças organolépticas de ambos: o ananás tem um paladar ácido, tamanho e coroas pequenas, casca laranja quando maduro; o abacaxi é superior no tamanho do fruto e coroa, os tons da casca quando maduro variam entre amarelo e castanho (Figura 11). Os frutos não crescem em contacto com o solo como a alface, a planta tem cerca de 1 metro de altura e o ananás cresce no topo (Bartholomew *et al.*, 2003).

Nas figuras 12 e 13 apresentam-se os resultados obtidos para a contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae*, respectivamente, nas cascas dos dois frutos.





**Figura 13.** Contagem de *Enterobacteriaceae* nas cascas de dois frutos, ananás e abacaxi. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.

A análise estatística não demonstrou diferenças significativas entre as contagens de microrganismos totais nas cascas do ananás e do abacaxi ( $p > 0,050$ ; Figura 12). Apesar do modo de produção ser diferente, a carga microbiana é semelhante. Esta contaminação pode ter mais a ver com a higiene na colheita, cuidados dos agricultores, tipo de armazenamento e abundante manuseamento do produto, do que com a flora autóctone do solo ou fertilização das terras. Eram esperados níveis de contaminação microbiana total elevados devido ao grande número de reentrâncias na sua fisionomia. Quanto à contagem de *Enterobacteriaceae* (Figura 13), indicadores da qualidade de higiene de produção, também não foram observadas diferenças pelo tratamento estatístico ( $p > 0,050$ ). Contudo, enquanto os ananases apresentaram um nível de contaminação constante, foram observadas grandes oscilações nos abacaxis; encontraram-se amostras com contagens microbianas muito baixas e amostras com uma carga microbiológica muito elevada. Esta grande discrepância pode dever-se à proveniência dos abacaxis: maior variedade de produtores de diferentes origens e com diferentes práticas no manuseamento dos frutos.

Foram obtidas contagens de *E. coli* em dois abacaxis e de *Staphylococcus coagulase* positiva num único abacaxi, na ordem dos  $10^3$  UFC/g ( $\log_{10}=3$ ), não sendo considerada significativa ( $p > 0,050$ ) a diferença entre os dois tipos de fruto. Não era esperada elevada contaminação pelo indicador fecal nestes produtos, já que não crescem em contacto com o solo. Além disso, o seu ciclo, da plantação até à colheita, desenrola-se entre 12 a 36 meses

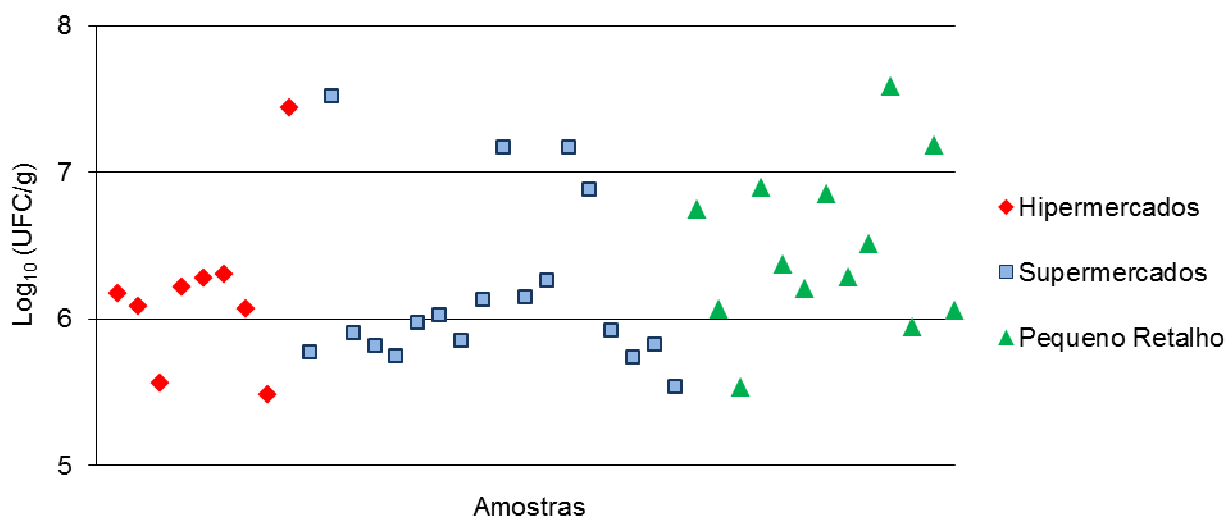
(Bartholomew *et al.*, 2003), alargando a época de aplicação dos adubos orgânicos de origem animal até ao desenvolvimento do fruto.

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi positiva apenas para um ananás. A presença do patógeno na casca pode constituir um risco para a saúde na medida em que: pode contaminar outros produtos com que contacta e no processo de descasque ser transportado para o interior, proliferando sem ser afectado pela acidez do fruto (pH entre 3,3 a 5,7) ou pelas temperaturas de refrigeração quando colocado no frigorífico (Beuchat, 1998; Gram, 2004; FDA, 2009).

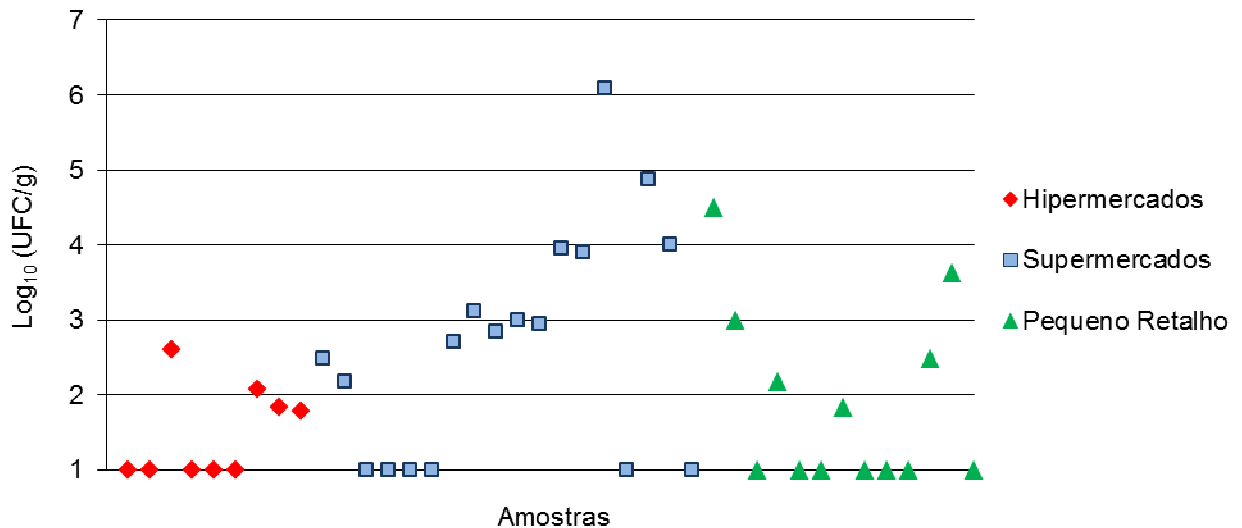
A pesquisa de *Salmonella* spp. foi negativa para todas as amostras dos frutos analisadas.

Não se verificam diferenças na carga microbiana das cascas do ananás e abacaxi, apesar do distinto modo de produção e origem. Em todo o documento, salvo neste estudo referente ao tipo de cultivo, quando é apresentado o termo “ananás” pretende-se referir o conjunto de amostras ananás e abacaxi estudados.

Nas figuras 14 e 15 é apresentado o resultado obtido para a contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae*, comparando os diferentes locais de distribuição do ananás.



**Figura 14.** Contagem de microrganismos totais em ananases adquiridos em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.



**Figura 15.** Contagem de *Enterobacteriaceae* em ananases adquiridos em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.

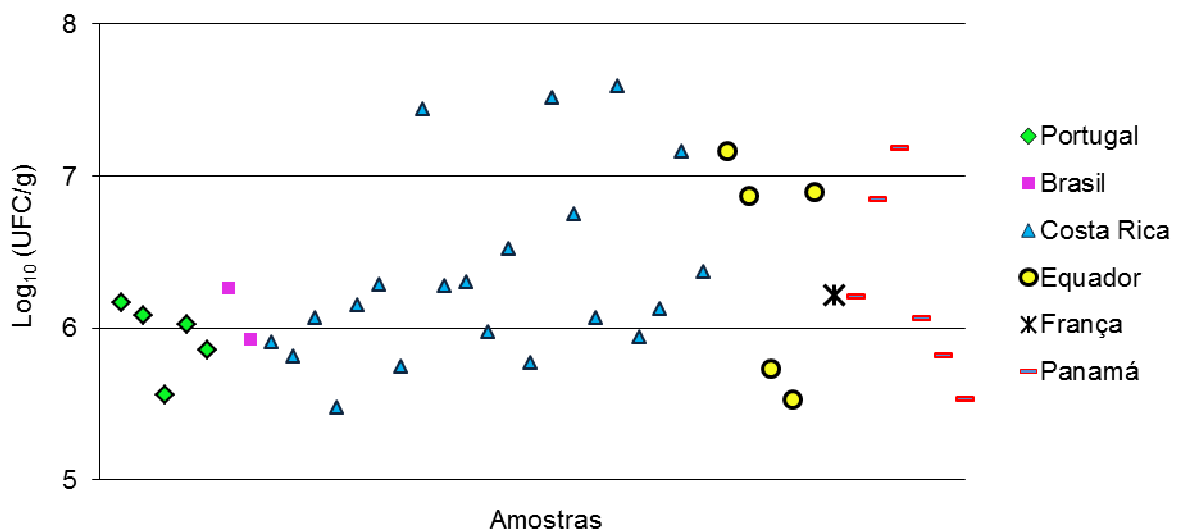
Tal como para as alfaces, os hipermercados e supermercados, exigem a qualificação dos seus fornecedores de frutos tropicais. Quando vêm de países longínquos trabalham com cooperativas agrícolas, sendo rigorosos no conhecimento do controlo de aplicação de pesticidas, de acordo com a produção integrada, mas não a nível do controlo microbiológico. Neste tipo de produtos, após a colheita, o único tratamento realizado é a aplicação de fitoquímicos para evitar a podridão dos frutos. Durante todo o período de transporte e armazenamento, garantem a refrigeração a 10 °C, não sendo tão restritivos como no caso da alface. O pequeno retalho, em grande maioria, compra nos mercados abastecedores, interrompendo muitas vezes a cadeia de frio a partir do transporte até ao armazenamento em loja. Os mercados abastecedores, por sua vez, têm exigências similares às dos hipermercados/supermercados para as cooperativas agrícolas. Assim não seriam esperadas grandes diferenças na contaminação microbiana de frutos adquiridos em diferentes tipos de estabelecimentos de distribuição portugueses. Isto é confirmado pela análise da figura 14 e pela análise estatística dos resultados ( $p > 0,050$ ). O mesmo não acontece na contagem de *Enterobacteriaceae* (Figura 15), observando-se diferenças significativas entre as amostras adquiridas em supermercados ou em hipermercado ( $p = 0,026$ ). As amostras provenientes de supermercados apresentaram valores superiores de contaminação, levando a inferir sobre uma menor qualidade de higiene no armazenamento e exposição. Provavelmente, a distinta população analisada em cada grupo teve aqui influência: nove amostras de hipermercados, dezoito de supermercados e treze de estabelecimentos de pequeno retalho. No grupo

“supermercado” o número de estabelecimentos de compra é bastante superior ao dos hipermercados, isto implica que o número de produtores aumente e consequentemente a carga microbiana seja diferente.

Contagens de *E. coli* e de *Staphylococcus* coagulase positiva foram obtidas apenas em três ananases: dois para a *E. coli* no grupo dos supermercados, um para *Staphylococcus* spp. nos hipermercados.

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi positiva apenas para um ananás pertencente ao grupo dos supermercados, correspondendo a 2,5 % das amostras.

As figuras 16 e 17 apresentam o resultado obtido para a contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae*, comparando os países de onde os frutos provieram.



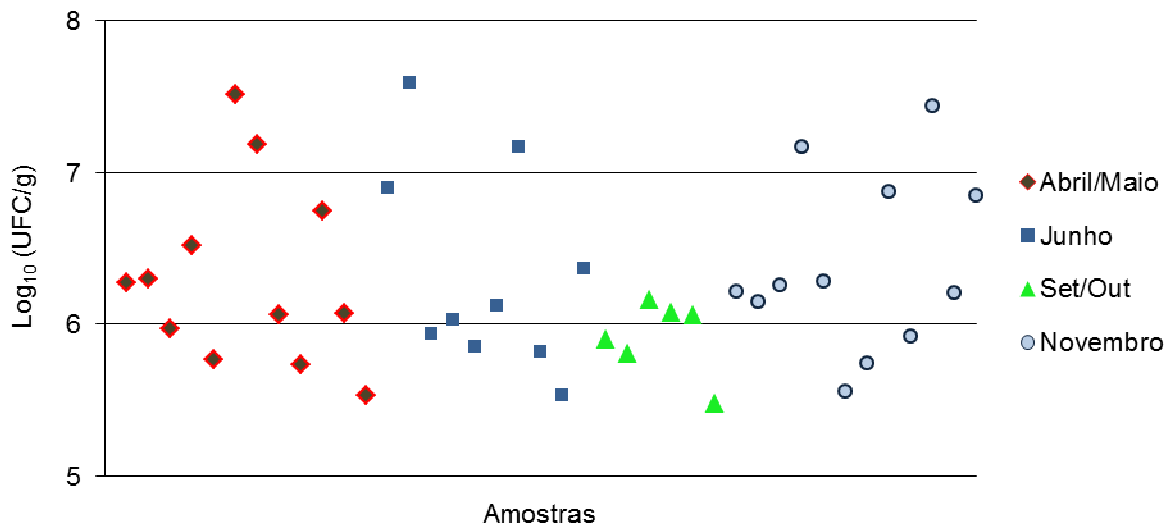
**Figura 16.** Contagem de microrganismos totais de ananases oriundos de diferentes países. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.



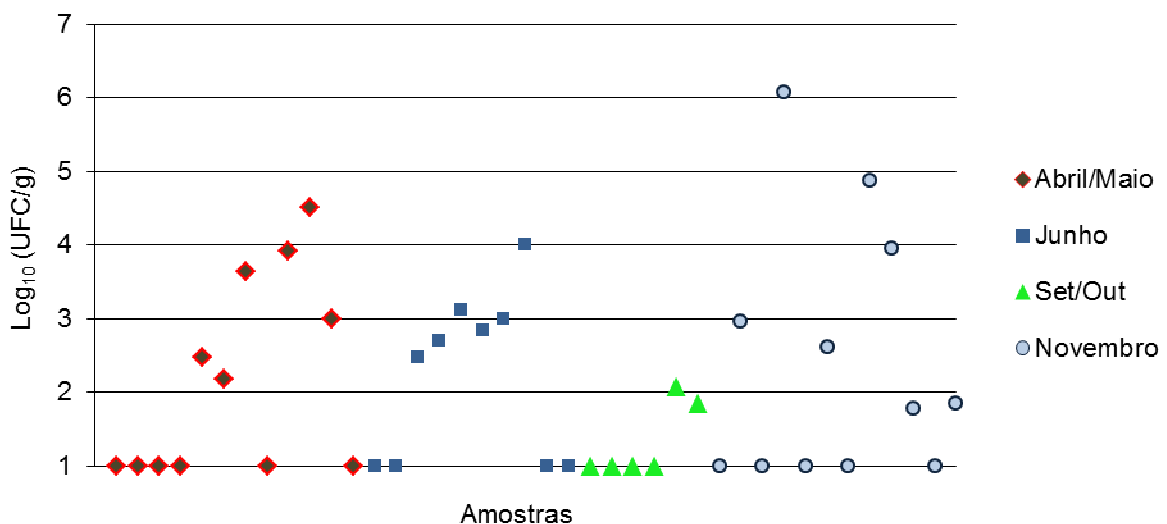


seus produtos não apresentam contaminações significativamente diferentes das dos produtos provenientes dos outros países.

Outra variável estudada foi a época do ano em que os frutos foram adquiridos. Nas figuras 18 e 19 são apresentados os resultados obtidos para a contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae*.



**Figura 18.** Contagem de microrganismos totais nos ananases adquiridos em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.



**Figura 19.** Contagem de *Enterobacteriaceae* nos ananases adquiridos em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.

Em países com clima favorável, a produção de ananás pode ser feita em qualquer altura do ano. Nos Açores são produzidos em estufa, não havendo impedimento relativamente a este facto. Nos países tropicais, a temperatura ronda os valores necessários ao seu crescimento (21 °C a 32 °C) (Bartholomew *et al.*, 2003). Pela análise das figuras 18 e 19 e de acordo com a análise estatística dos resultados, não foram registadas diferenças significativas ( $p > 0,050$ ) na contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae* nos frutos adquiridos em diferentes épocas do ano.

Os grandes importadores de ananás preocupam-se mais a nível da qualidade química do que microbiológica, devido ao facto de não ser consumido com a casca. De qualquer forma, exigem que o transporte seja feito nas condições aconselhadas de refrigeração, 10 °C, para evitar o rápido amadurecimento (Bartholomew *et al.*, 2003), não estando directamente relacionado com o controlo microbiano. Como produtos de alta manipulação por parte de produtores e consumidores antes do processo de venda, é natural transportarem uma elevada carga microbiana na superfície, apesar de não crescerem em contacto com o solo.

## **Meloa**

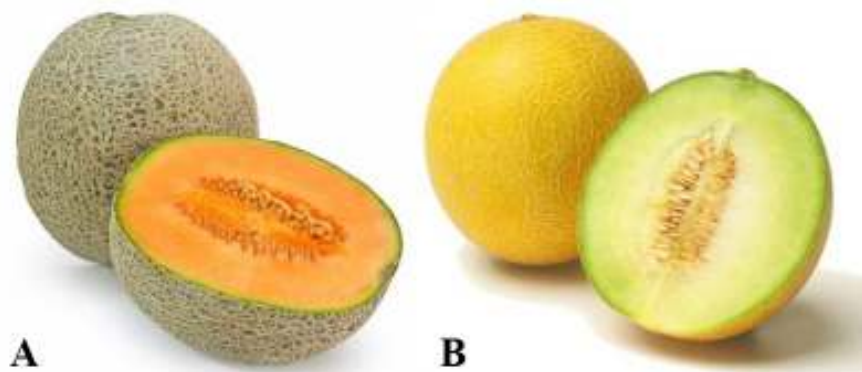
A meloa é outro exemplo de um fruto consumido cru e não tem qualquer tipo de tratamento prévio pós colheita. Não é habitualmente lavado pelos consumidores antes do processo de descasque e possui uma considerável rugosidade em torno de toda a casca, possivelmente capaz de transportar microrganismos. Assim, tornou-se também interessante analisar a carga microbiana da casca deste fruto.

Num período de um ano foram analisadas as cascas de 40 meloas de diversas origens, comprados em vários locais situados no Grande Porto. Fez-se a comparação das amostras através da contagem de microrganismos totais, de *E. coli*, de *Enterobacteriaceae* e de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g), pesquisa de *Salmonella* spp. e de *L. monocytogenes*, contando com várias variáveis: a variedade de fruto (Gália ou Cantaloupe), o local de distribuição, a origem e a época do ano em que foram adquiridas.

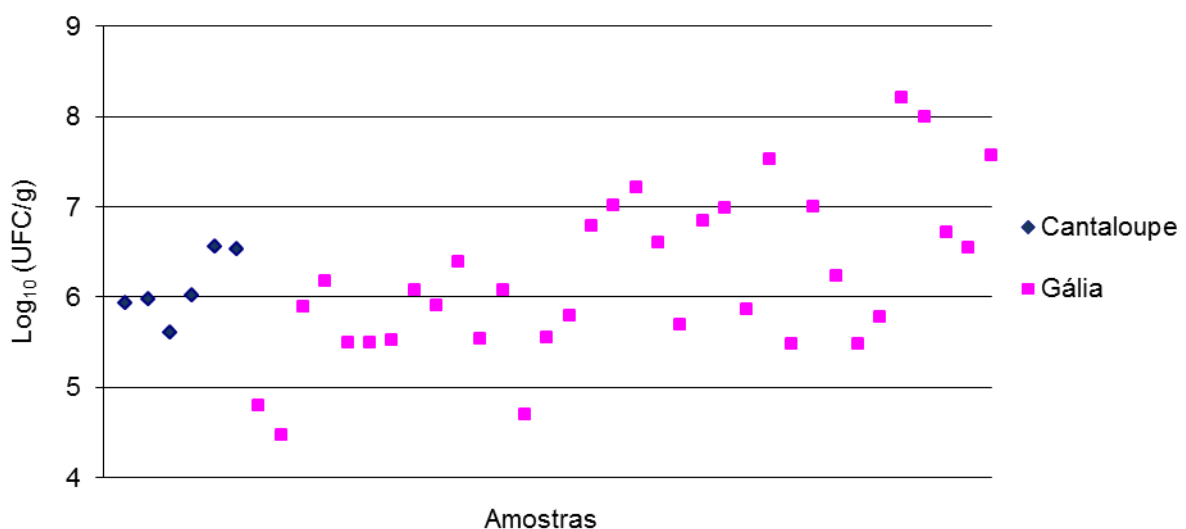
A primeira variável apresentada é a variedade do fruto. As meloas estudadas pertencem à mesma espécie, mas com variedades diferentes: a meloa vulgarmente conhecida por Cantaloupe é cientificamente designada por *Cucumis melo* L. var. *cantalupensis* Naudin, enquanto que a meloa Gália é *Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Naudin. A primeira possui uma casca espessa e rugosa, verde-acinzentada e o interior cor de laranja. A segunda contém

uma casca lisa com um tom amarelado, mas densamente reticulada (pequenas fibras que formam uma rede), o interior é verde esbranquiçado (Figura 20) (Baker, 1980; Stepansky *et al.*, 1999; Kourkoutas *et al.*, 2006; El-Assi *et al.*, 2011).

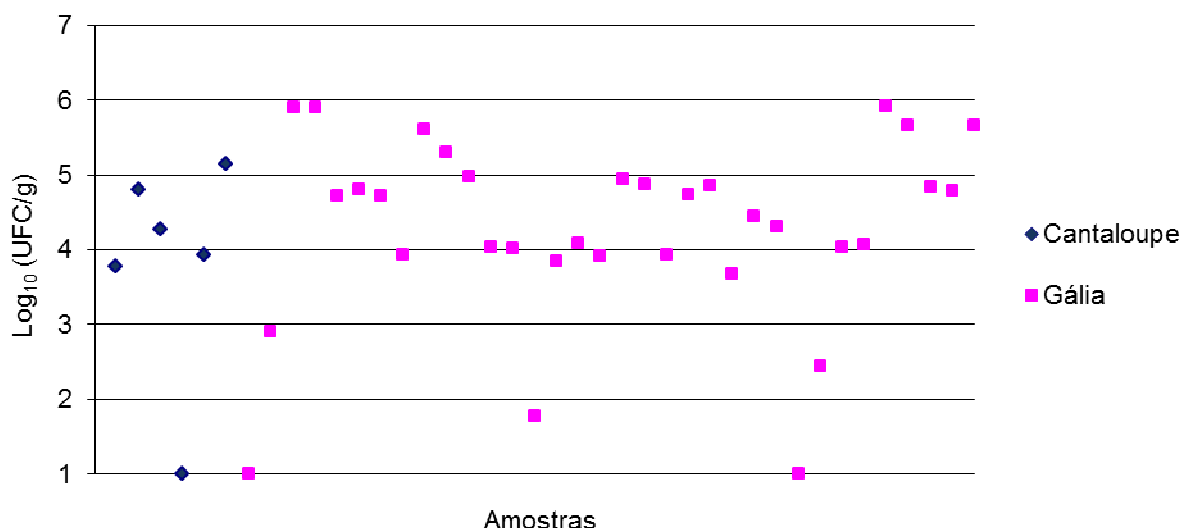
As figuras 21 e 22 apresentam o resultado obtido na contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae*, respectivamente, nas cascas das duas variedades de meloão analisadas.



**Figura 20.** Representação das duas variedades de meloão analisadas. A - Melo Cantaloupe (De: <http://www.asklubo.com/en/fooddrinks/howtoavoidbuyingrottencantaloupe>; Acedido em: 5 de Novembro de 2011); B - Melo Gália (De: <http://www.leshop.ch/leshop/Main.do/direct/en/Supermarket/-17789/-10208/12463>; Acedido em: 5 de Novembro de 2011).



**Figura 21.** Contagem de microrganismos totais de meloões de duas variedades, Cantaloupe e Gália. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.



**Figura 22.** Contagem de *Enterobacteriaceae* de melões de duas variedades, Cantaloupe e Gália. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.

O meloeiro é uma planta trepadeira originária da África Central, preferindo temperaturas entre os 13 e 30 °C, dependendo da variedade. O meloeiro, em ambas as variedades, pode ser plantado em estufa ou ao ar livre. Quando o cultivo é em estufa, a planta é orientada para crescer na vertical até uma altura mínima de 1,80 m e os frutos podem ser suspensos num saco de rede preso às vigas do tecto ou a arames. Quando o cultivo é ao ar livre, a planta cresce na horizontal e nalguns casos os frutos são protegidos com uma base, separando-os do solo, como aconselham as boas práticas. A planta não é muito exigente na sua produção, requerendo apenas solos férteis, bem drenados e com pH neutro (Baker, 1980).

A figura 21 e o consequente teste estatístico não demonstram diferenças significativas na contagem de microrganismos totais entre as cascas dos dois tipos de meloa ( $p > 0,050$ ). Verificou-se o mesmo para a contagem de *Enterobacteriaceae* (Figura 22), ( $p > 0,050$ ). Apesar das diferenças evidentes nas cascas das duas variedades de meloa, a contaminação microbiana foi semelhante para todas as amostras analisadas.

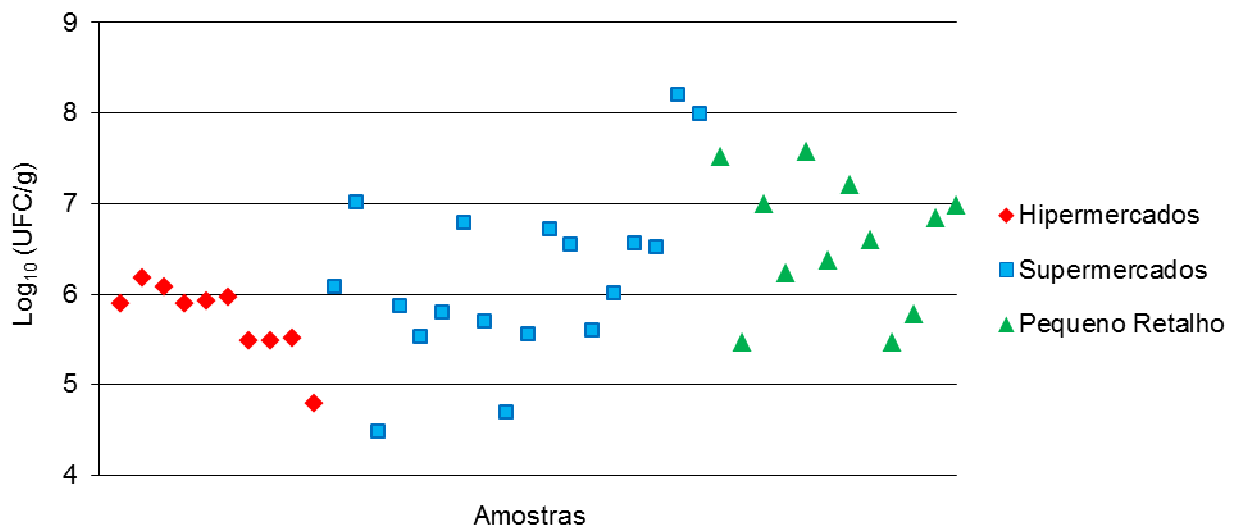
A pesquisa de *L. monocytogenes* foi positiva apenas para uma meloa pertencente à variedade Gália, o que corresponde a 2,5 % de amostras positivas para esta bactéria. No entanto, a presença do patógeno na casca do fruto poderia constituir um risco para a saúde, como anteriormente explicado na análise dos ananases. O pH da meloa é ligeiramente ácido (5,9 e 6,7) (Golden *et al.*, 1993; Nuñez-Paleniús *et al.*, 2007), sendo possível também uma proliferação fácil deste patógeno no interior do fruto após o processo de descasque, como

observado no recente surto de infecção alimentar nos Estados Unidos da América (CDC, 2011).

As contagens de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva mantiveram-se inferiores aos limites de detecção das técnicas ( $1,5 \times 10^1$  UFC/g). Visto que os frutos crescem protegidos e sem ser em contacto com o solo, não seria esperada contaminação fecal nas amostras.

A pesquisa para *Salmonella* spp. foi negativa para todas as meloas analisadas.

Estudou-se também a variável do local de distribuição das meloas. Nas figuras 23 e 24 é apresentado o resultado obtido para a contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae*, comparando os diferentes locais de distribuição.



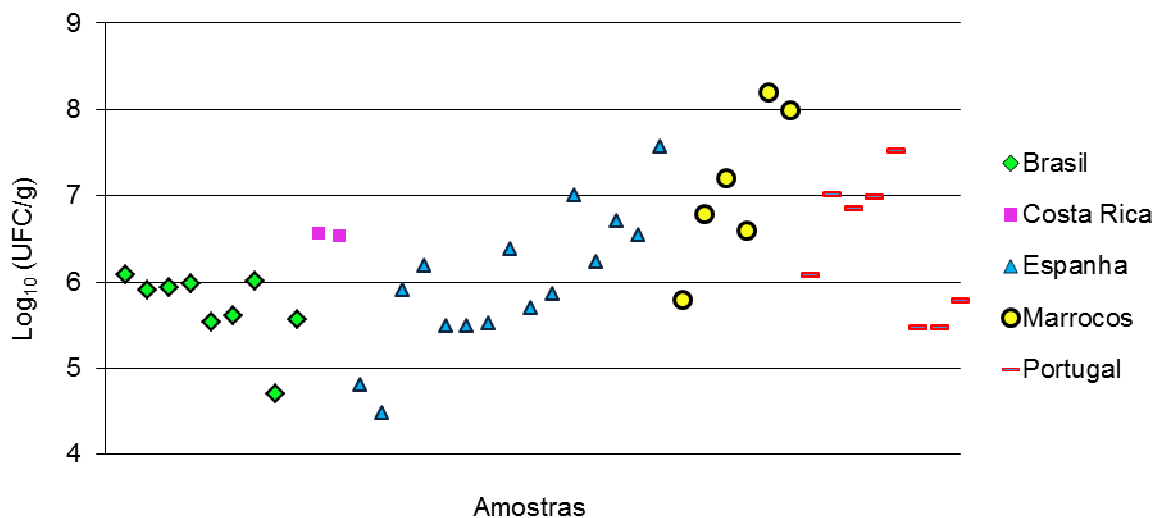
**Figura 23.** Contagem de microrganismos totais em meloas adquiridas em diferentes tipos de estabelecimentos. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.



frequência a rotatividade dos seus produtos, assemelhando-se mais ao que acontece no pequeno retalho, e aumentando por isso, a variabilidade entre amostras nesse grupo. Esta diferença entre os locais de distribuição já foi verificada nas contagens de *Enterobacteriaceae* dos ananases. Contudo, no caso das meloas, apesar de se registarem resultados distintos na contagem de microrganismos totais, o mesmo não se verificou para a contagem de *Enterobacteriaceae*. A análise da figura 24 e o tratamento estatístico dos resultados permitiram concluir que não existiram diferenças entre os distribuidores ( $p>0,050$ ), revelando que, provavelmente, o nível de higiene no armazenamento e exposição é semelhante entre todos.

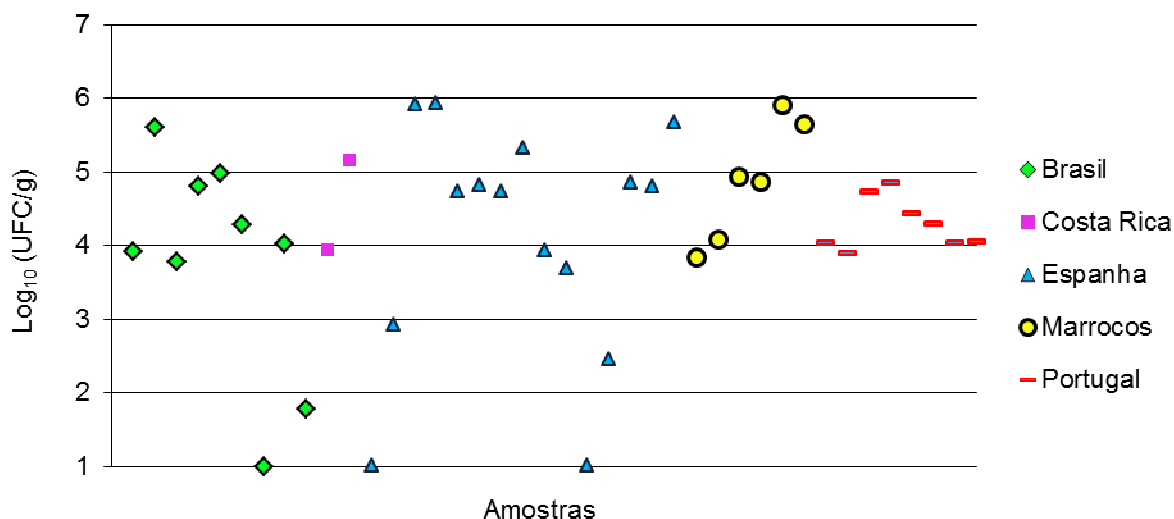
A pesquisa de *L. monocytogenes* foi positiva apenas para uma meloa pertencente ao grupo dos hipermercados, correspondendo a 2,5% das amostras.

As figuras 25 e 26 apresentam o resultado obtido para a contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae*, comparando os países de onde os frutos provieram.



**Figura 25.** Contagem de microrganismos totais em meloas oriundas de diferentes países. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.



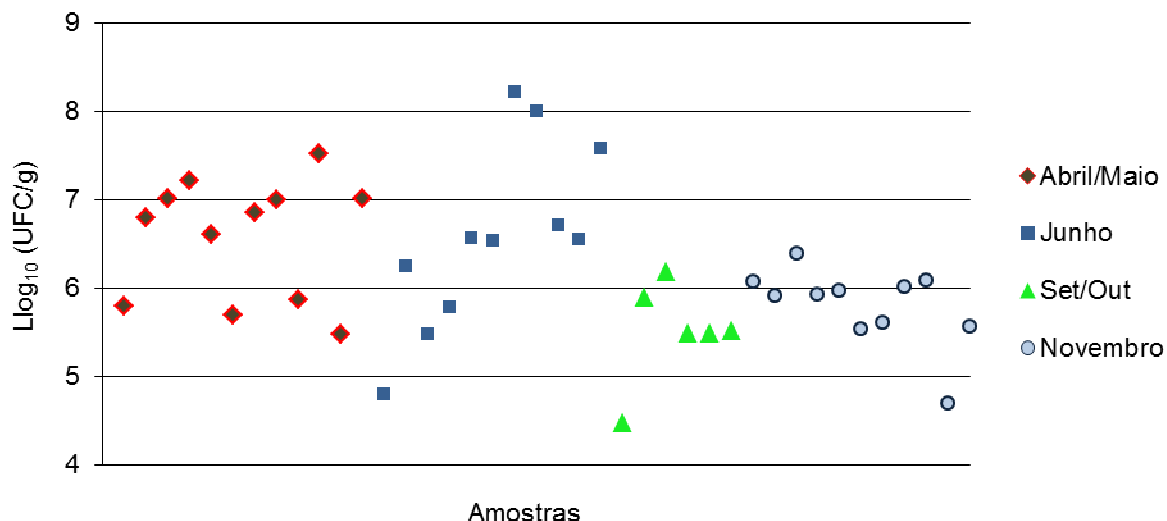


**Figura 26.** Contagem de *Enterobacteriaceae* em meloas oriundas de diferentes países. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.

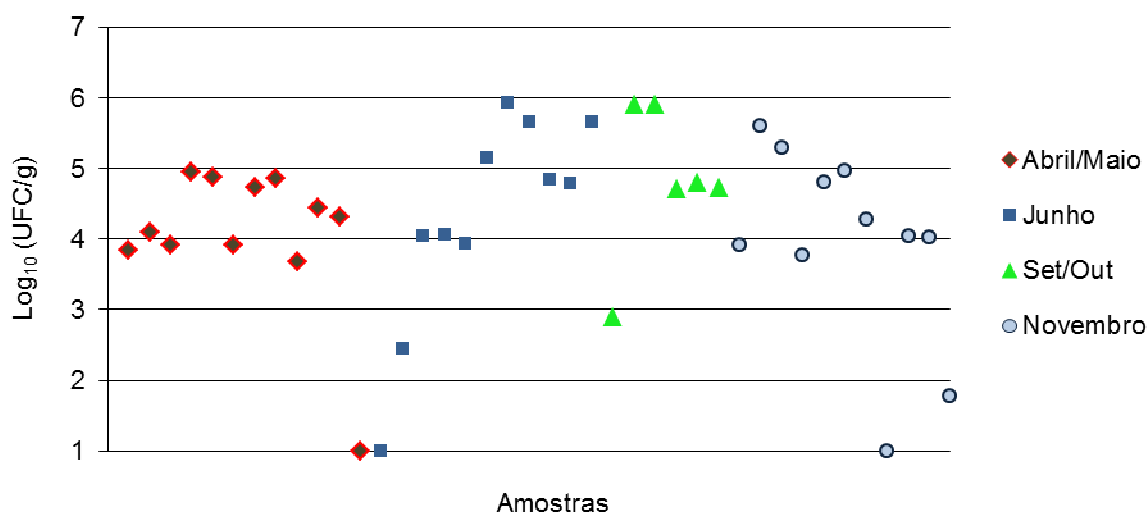
Os países apresentados são os possuem maior impacto na venda deste fruto para os distribuidores do Grande Porto. As meloas espanholas são as mais encontradas a nível da distribuição no Grande Porto. Pela análise da figura 25 e pelo tratamento estatístico realizado para a contagem de microrganismos totais, detectaram-se diferenças entre as amostras oriundas dos vários países ( $p=0,010$ ). As meloas oriundas de Marrocos foram as que apresentaram maior contaminação ao nível da casca. De acordo com o Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), Marrocos também se enquadra nos países em vias de desenvolvimento (Klugman, 2010), indicando uma qualidade e condições de vida inferior aos países europeus. Quanto à contagem de *Enterobacteriaceae* (Figura 26), não se verificaram diferenças significativas entre as origens das meloas ( $p>0,050$ ), a qualidade de higiene de produção e armazenamento parece muito semelhante entre todos os locais.

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi positiva apenas para uma meloa proveniente de Espanha, correspondendo a 2,5 % das amostras.

As figuras 27 e 28 demonstram os resultados obtidos para a contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae*, respectivamente, comparando a época do ano em que as meloas foram adquiridas.



**Figura 27.** Contagem de microrganismos totais nas meloas adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.



**Figura 28.** Contagem *Enterobacteriaceae* nas meloas adquiridas em diferentes épocas do ano. Cada marcador corresponde a uma amostra analisada.

Como já referido, o meloeiro prefere temperaturas entre os 13 e 30 °C, dependendo da variedade. Pela análise da figura 27 são constatadas diferenças na carga microbiana total entre os primeiros e os últimos meses do ano, comparando Abril/Maio e Junho com Setembro/Outubro e Novembro ( $p=0,006$ ). Em todas as épocas foram compradas amostras de todos os países, não havendo uma ligação entre a época de compra do produto e o país originário. Contudo, a diferença notada é justificada pela coincidência de nos primeiros meses

do ano terem sido compradas bastante mais amostras do supermercado e pequeno retalho, os quais demonstraram um maior nível de contaminação descrito anteriormente (Figura 23).

Não foram registadas diferenças significativas entre as épocas do ano do estudo para a contagem de *Enterobacteriaceae* ( $p>0,050$ ; Figura 28).

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi positiva apenas numa meloa analisada em Junho, assim como ocorreu nas alfaces, correspondendo a 2,5 % das amostras.

Comparando os três produtos hortofrutícolas pela média da carga microbiana encontrada no conjunto de amostras, nota-se uma ligeira diferença entre os frutos e a alface (Tabela 3). Um elevado número de microrganismos totais foi obtido para ambos os frutos, mas inferior ao da alface. O mesmo foi observado para as *Enterobacteriaceae*. Sendo produtos de intensa manipulação por parte de produtores e consumidores antes do processo de venda, seria expectável apresentarem uma elevada carga microbiana na superfície. Contudo, como a alface cresce em contacto directo com o solo, é natural que exiba uma carga microbiana superior. Nota-se também que no ananás a contagem dos indicadores de higiene foi inferior à dos outros produtos. Como referido anteriormente, a sua manipulação é semelhante aos restantes, mas o fruto cresce suspenso, a cerca de 1 metro de distância do solo. No caso das meloas, quando cultivadas em estufa também crescem suspensas, no entanto, quando crescem ao ar livre, estão mais próximas do solo e pode acontecer que nem todos os produtores coloquem as bases entre o solo e a fruta para sua protecção, como aconselham as boas práticas. A diferença apresentada pode advir do facto referido.

**Tabela 3.** Média (em  $\text{Log}_{10}$  (UFC/g)) da contagem de microrganismos totais e de *Enterobacteriaceae* para todas as amostras de cada produto hortofrutícola.

	Alface	Ananás	Meloa
<b>Contagem de microrganismos totais</b>	7,4	6,2	6,2
<b>Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i></b>	4,8	2,1	4,1

Foram obtidos valores semelhantes na contagem de *Enterobacteriaceae* em alfaces de origem espanhola (Abadias *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2010). Não foi encontrada bibliografia referente às contagens de microrganismos totais ou de *Enterobacteriaceae* nas cascas dos

frutos estudados, mas observaram-se contagens de *Enterobacteriaceae* semelhantes em frutas pré-cortadas em Espanha (Abadias *et al.*, 2008).

Apesar dos valores elevados de contagens na alface, o produto é posteriormente lavado e temperado com vinagre (ácido acético) antes do consumo, o que reduz a carga microbiana. No caso da casca das frutas, geralmente não são lavadas antes do processo de descasque, podendo contaminar o interior.

Uma maior população analisada de cada produto hortofrutícola poderia reforçar as conclusões deste trabalho. Em muitos dos resultados obtidos, em relação à qualidade microbiológica dos produtos analisados, foi observada uma variabilidade elevada dentro do mesmo grupo (como por exemplo no caso dos supermercados que apresentaram amostras muito díspares), o que se justifica pelo facto de muitos dos alimentos vendidos no mesmo local e pertencentes ao mesmo lote não terem o mesmo produtor. Em determinadas situações, principalmente no caso dos frutos importados, as cooperativas agrícolas agregam hortofrutícolas de vários pequenos produtores, em que os solos e frequência de adubação poderão ser diferentes. Essas cooperativas recolhem os hortofrutícolas dos vários pequenos produtores, procedem ao sistema de lote das amostras e exportam os produtos como sendo da mesma produção.

## **Caracterização das estirpes isoladas**

### ***Staphylococcus* coagulase positiva**

A grande maioria das gastroenterites provocadas por *Staphylococcus* spp. são atribuídas às estirpes coagulase positiva, nomeadamente *S. aureus*. No entanto, *S. intermedius* e *S. hyicus*, também coagulase positivos, têm a capacidade de produzir enterotoxinas (Montville e Matthews, 2008).

Das 120 amostras analisadas, a enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva foi possível em quatro amostras, das quais três eram alfaces e uma era um ananás. Para aprofundar o estudo a nível destas estirpes, procedeu-se a testes básicos de identificação, seguindo-se uma identificação presuntiva demonstrada na tabela 4. Pela coloração de Gram foi possível verificar que a morfologia celular se mostrou idêntica em todas as estirpes (cocos Gram positivos). Os isolados 1 e 2 pertencem à mesma amostra, uma alface lisa do pequeno

retalho. Os isolados 3 e 4 pertencem a uma alface frisada do hipermercado. Os isolados 5 e 6 foram oriundos de uma alface lisa do supermercado e o isolado 7 de um abacaxi da Costa Rica adquirido num hipermercado.

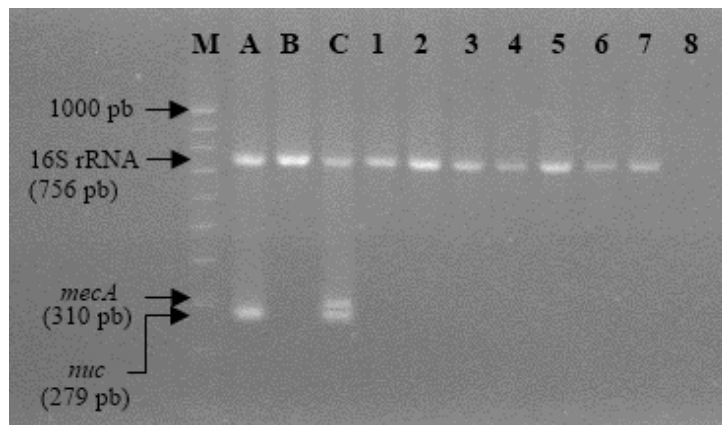
**Tabela 4.** Resultado dos testes de identificação para os 7 isolados *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos, em comparação com espécies coagulase positiva conhecidas (Richardson *et al.*, 1992).

	1	2	3	4	5	6	7	<i>S. aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. hyicus</i>
<b>Oxidase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Fermentação Manitol</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Os sete isolados apresentaram igual resultado para os testes da oxidase, catalase e fermentação do manitol. Provavelmente não pertencem à espécie *S. hyicus*, na medida em que esta não fermenta o açúcar e as amostras mostraram ser todas fermentadoras do açúcar referido. Pela análise da tabela 4 poderiam pertencer a uma das espécies: *S. aureus* ou *S. intermedius*.

#### PCR Multiplex

Para mais informação sobre as estirpes, realizou-se um PCR no qual se avaliou a presença dos genes 16S rRNA (específico do género *Staphylococcus*), *nuc* (específico da espécie *S. aureus*) e *mecA* (gene determinante da resistência à meticilina) (Zhang *et al.*, 2004). Na figura 29 é apresentada a fotografia de um gel de electroforese contendo os fragmentos de DNA amplificados correspondentes aos genes constituintes dos controlos e de cada uma das amostras.



**Figura 29.** Gel de agarose com o resultado do PCR Multiplex para detecção dos genes 16S rRNA, *mecA* e *nuc* amplificados simultaneamente. M - marcador; A – *S. aureus* ATCC 29213 (que possui os genes 16S rRNA e *nuc*); B – *S. epidermidis* DSM 20044 (que possui apenas 16S rRNA); C - *S. aureus* DSM 11729 (que possui os genes 16S rRNA, *nuc* e *mecA*); 1 a 7 – isolados dos produtos hortofrutícolas; 8 – Branco.

Perante os resultados apresentados na figura 29 conclui-se que nenhum dos isolados oriundos dos produtos hortofrutícolas analisados é *S. aureus*, na medida em que não apresentaram o gene *nuc*. Contudo, confirma-se que pertenciam ao género *Staphylococcus*, já que o gene 16S rRNA estava presente em todos. Há ainda a possibilidade de pertencerem à espécie *S. intermedius*, tendo em conta que os testes de identificação efectuados estão de acordo com os descritos anteriormente para esta bactéria (Tabela 4). Segundo Zhang e os seus colaboradores (2004), dos genes amplificados, *S. intermedius* contem apenas o 16S rRNA. No entanto, para confirmar esta hipótese seriam necessários mais testes de identificação. Não foi encontrado o gene que confere resistência à metilina nas bactérias isoladas.

### Susceptibilidade antimicrobiana

Os produtos alimentares podem ser veículos de transmissão de bactérias resistentes a antibióticos. O uso destes compostos em humanos ou como promotores de crescimento na criação de animais leva a que parte da flora intestinal seja resistente (Hawkey, 1986; Pereira *et al.*, 2009). Esta contaminação pode passar aos produtos hortofrutícolas através do solo, tendo sido já documentas bactérias resistentes a alguns antibióticos em alface (Bezanson *et al.*, 2008).

Uma preocupação específica em relação aos *Staphylococcus* coagulase positiva é a elevada resistência a diversos antimicrobianos, nomeadamente *S. aureus*, dos quais muitos

são resistentes à meticilina (MRSA) (Aires de Sousa *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2004; CLSI, 2007). Apesar de não terem sido encontrados *S. aureus* nas amostras de produtos hortofrutícolas e nenhuma da espécie possuir o gene de resistência à meticilina (Figura 29), foi realizada a susceptibilidade antimicrobiana para analisar a susceptibilidade dos 7 isolados a outros fármacos. Na tabela 5 são apresentados os resultados obtidos para os valores de CMI em cada isolado, assim como a sua interpretação (sensível, intermédio ou resistente) segundo o CLSI (2007).

Inicialmente, a aplicação da penicilina e outros  $\beta$  - lactâmicos (como a ampicilina) em doentes com diversas infecções por estafilococos era eficaz, mas depois de alguns anos de uso clínico, começaram a aparecer resistências devido à produção de  $\beta$  - lactamases por parte de algumas bactérias, que hidrolisam os  $\beta$  - lactâmicos, deixando de surtir efeito inibidor. A meticilina foi introduzida de forma a escapar a essas resistências, mas rapidamente foram identificados MRSA. Apesar disto, existem ainda espécies do género referido que não são produtoras de  $\beta$  - lactamases, nas quais a penicilina e ampicilina são eficazes, assim como existem estirpes resistentes à penicilina ou ampicilina, mas susceptíveis à meticilina (Sousa, 2005; Palavecino, 2007). A oxacilina, outro antibiótico pertencente à classe da penicilinas, é também activo contra estafilococos produtores de  $\beta$  - lactamases. A sua estrutura química (presença de um grupo isoxazolidina) dificulta o ataque das  $\beta$  - lactamases ao anel  $\beta$  - lactâmico. Este fármaco ultimamente é utilizado em substituição da meticilina, tanto em testes *in vitro*, como em tratamento de pacientes (Sousa, 2005; CLSI, 2007). Pela tabela 5 verifica-se que a maioria das estirpes adquiridas eram sensíveis aos  $\beta$  - lactâmicos. Como excepção, os isolados 6 (oriundo da alface) e 7 (proveniente do ananás) mostraram-se resistentes, produzindo  $\beta$  - lactamases que hidrolisaram a penicilina G e a ampicilina. Contudo, a protecção do anel  $\beta$  - lactâmico existente na oxacilina foi suficiente para tornar estas estirpes sensíveis ao mesmo, não sendo considerados MRS (*Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina). O isolado 3 (alface) apresentou-se resistente à penicilina G, mas não é produtor de  $\beta$  - lactamases já que é sensível à ampicilina. Estes resultados confirmam a ausência da banda do gene *mecA* (Figura 29), demonstrando que nenhuma das estirpes é resistente à meticilina.

A vancomicina tem sido o antibiótico de eleição no tratamento de infecções por MRSA, contudo já existem casos de resistência ao mesmo (Tenover, 1999; Palavecino, 2007). Na tabela 5 são observados 3 isolados que se mostram intermédios (1, 5 e 7), mas nenhum resistente.

Os aminoglicosídeos são também fármacos de eleição na terapêutica de infecções graves por cocos Gram positivos, nomeadamente a gentamicina (Sousa, 2005). Os macrólidos

(eritromicina) têm sido indicados em alternativa às penicilinas e são activos em infecções por estafilococos. A tetraciclina é outro composto activo contra estafilococos, no entanto, se as estirpes forem MRS, geralmente são resistentes também à tetraciclina, assim como a aminoglicosídeos e eritromicina (Bou, 2007). Neste caso, todos os isolados apresentaram susceptibilidade à gentamicina, eritromicina e tetraciclina (Tabela 5), visto que nenhum é MRS.

A ciprofloxacina, uma fluorquinolona, têm acção limitada contra Gram positivos, contudo já foi demonstrada eficácia em MRSA (Smith *et al.*, 1988; Sousa, 2005). Pela tabela 5, apenas os isolados 4 e 6 mostraram-se intermédios na susceptibilidade, mas nenhum é resistente.

A nitrofurantoína actua contra estafilococos e normalmente não é adquirida resistência a este antibiótico (Sousa, 2005). O cloranfenicol consegue ser activo em diversas espécies de *Staphylococcus*, no entanto já existem vários casos de resistência a este antibiótico por parte de outras espécies do mesmo género, como o caso de *S. epidermidis* e *S. aureus* (Shaw *et al.*, 1970; Dutta *et al.*, 2001). Por último, a rifampicina é um antibiótico normalmente efectivo contra infecções por estafilococos, apesar de já ter sido documentada resistência por estirpes MRSA em hospitais japoneses durante o tratamento de pacientes com tuberculose (Sekiguchi *et al.*, 2006). Todos os isolados apresentaram sensibilidade aos antibióticos neste parágrafo referidos (Tabela 5).



**Tabela 5.** CMI obtida para cada isolado e referente interpretação segundo o CLSI (2007) em relação a todos os antibióticos analisados.

Classe	Antibiótico	Interpretação de acordo CLSI (2007)			CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos isolados e interpretação						
		Sensível (S)	Intermédio (I)	Resistente (R)	1	2	3	4	5	6	7
	<b>Ampicilina</b>	$\leq 0,25$	-	$\geq 0,5$	<0,125 (S)	<0,125 (S)	0,25 (S)	<0,125 (S)	0,25 (S)	1 (R)	4 (R)
<b>Penicilinas</b>	<b>Oxacilina</b>	$\leq 2$	-	$\geq 4$	<0,125 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	2 (S)	2 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)
	<b>Penicilina G</b>	$\leq 0,12$	-	$\geq 0,25$	<0,125 (S)	<0,125 (S)	0,25 (R)	<0,125 (S)	<0,125 (S)	2 (R)	8 (R)
<b>Glicopeptídeos</b>	<b>Vancomicina</b>	$\leq 2$	4-8	$\geq 16$	4 (I)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	4 (I)	2 (S)	4 (I)
<b>Aminoglicosídeos</b>	<b>Gentamicina</b>	$\leq 4$	8	$\geq 16$	0,5 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	<0,125 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
<b>Macrólidos</b>	<b>Eritromicina</b>	$\leq 0,5$	1-4	$\geq 8$	0,25 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
<b>Tetraciclinas</b>	<b>Tetraciclina</b>	$\leq 4$	8	$\geq 16$	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	1 (S)	0,5 (S)	2 (S)
<b>Fluorquinolonas</b>	<b>Ciprofloxacina</b>	$\leq 1$	2	$\geq 4$	0,5 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	2 (I)	0,25 (S)	2 (I)	0,25 (S)
<b>Nitrofurantoínas</b>	<b>Nitrofurantoína</b>	$\leq 32$	64	$\geq 128$	8 (S)	8 (S)	8 (S)	16 (S)	8 (S)	8 (S)	16 (S)
<b>Fenicois</b>	<b>Cloranfenicol</b>	$\leq 8$	16	$\geq 32$	8 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)
<b>Ansamícinas</b>	<b>Rifampicina</b>	$\leq 1$	2	$\geq 4$	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	<0,125(S)	<0,125(S)	<0,125 (S)

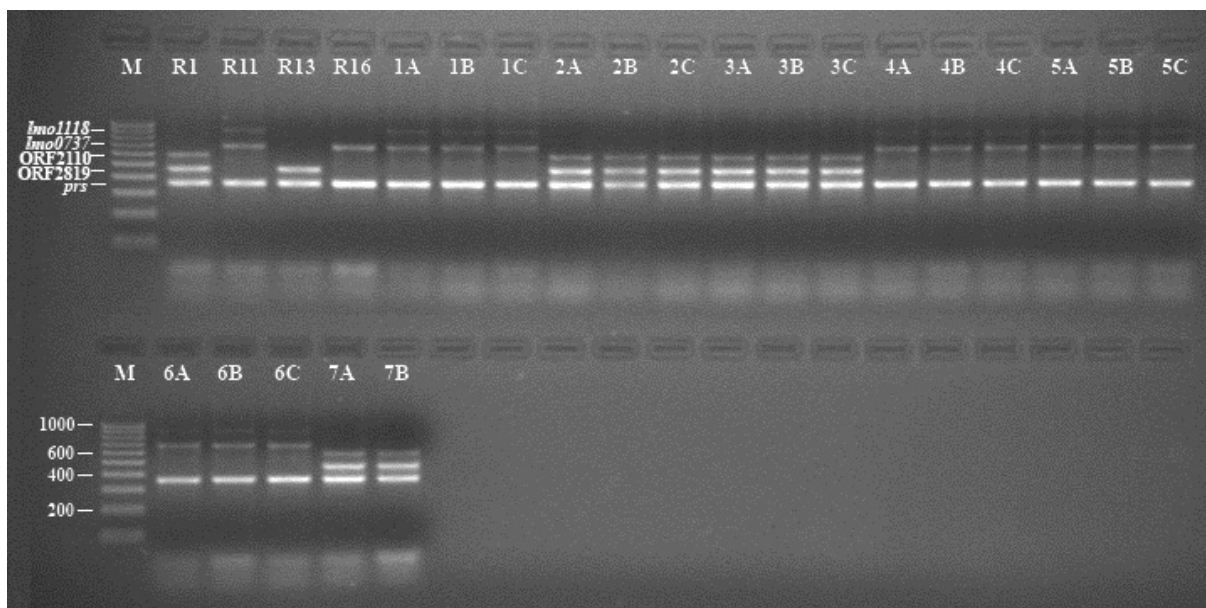
## *Listeria monocytogenes*

Das 120 amostras analisadas, a presença de *L. monocytogenes* foi detectada em 8, das quais 6 eram alfaces, 1 ananás e 1 meloa. Destas 8 amostras, foi adquirido um total de 21 isolados. Os isolados 1A, 1B e 1C pertencem à mesma amostra, uma alface lisa de um hipermercado; os isolados 2A, 2B e 2C são oriundos de uma alface lisa do campo; 3A, 3B e 3C pertencem a uma alface frisada do campo; 4A, 4B e 4C advêm de uma alface lisa do pequeno retalho; 5A, 5B e 5C são oriundos de uma alface lisa do pequeno retalho; 6A, 6B e 6C pertencem a uma alface frisada do hipermercado; 7A e 7B são os únicos isolados pertencentes a um ananás proveniente da Costa Rica e comprado num supermercado; 8A é o único isolado adquirido da meloa espanhola comprada num hipermercado.

### PCR Multiplex

A investigação de surtos de listeriose baseia-se na caracterização dos serótipos, dando uma informação valiosa sobre os principais grupos que participam na infecção (Doumith *et al.*, 2004). 13 serótipos são descritos para *L. monocytogenes* como sendo capazes de causar a doença, mas a maioria das estirpes isoladas de alimentos e pacientes pertencem aos serótipos 1/2a, 1/2b e 4b (Farber e Peterkin, 1991; McLauchlin *et al.*, 2004).

Para avaliar o grupo a que pertencem os isolados adquiridos foi realizado um PCR Multiplex segundo o método de Doumith e seus colaboradores (2004). A amplificação do gene *prs* e dos 4 fragmentos de DNA específicos de cada serótipo permite a separação de *L. monocytogenes* em quatro grupos: o grupo 1 compreende estirpes dos serótipos 1/2a e 3a, em que nestas são amplificados os genes *prs* e *lmo0737*; o grupo 2 compreende estirpes dos serótipos 1/2c e 3c, em que nestas são amplificados os genes *prs*, *lmo1118* e *lmo0737*; o grupo 3 compreende estirpes dos serótipos 1/2b, 3b e 7, em que nestas são amplificados os fragmentos *prs* e ORF2819; o grupo 4 compreende estirpes dos serótipos 4b, 4d e 4e, em que nestas são amplificados os fragmentos *prs*, ORF2819 e ORF2110. O gene *prs* é amplificado em todas as espécies do género *Listeria*. A figura 30 demonstra o resultado da amplificação dos fragmentos de DNA nas estirpes adquiridas nos produtos hortofrutícolas.



**Figura 30.** Gel de agarose com o resultado do PCR Multiplex para detecção dos fragmentos de DNA *lmo1118* (906 pb), *lmo0737* (691 pb), ORF2110 (597 pb), ORF2819 (471 pb) e *prs* (370 pb) amplificados simultaneamente. M - marcador; R1 - controlo *L. monocytogenes* NCTC 11994 (correspondente ao serótipo 4b); R11 - controlo *L. monocytogenes* CECT 911 (serótipo 1/2c); R13 - controlo *L. monocytogenes* CECT 936 (serótipo 1/2b); R16 - controlo *L. monocytogenes* CIP 104794 (serótipo 1/2a); 1A a 7B – isolados de *L. monocytogenes* adquiridos nas amostras dos produtos hortofrutícolas.

Pela análise da figura 30, observa-se que o gene *prs* foi amplificado em todos os isolados, o que era esperado já que são pertencentes à espécie *L. monocytogenes*. Os isolados 1A, 1B, 1C (oriundos da mesma amostra), 4A, 4B, 4C (mesma amostra), 5A, 5B, 5C (mesma amostra) e 6A, 6B, 6C (mesma amostra) apresentaram os fragmentos *lmo1118* e *lmo0737*, sendo enquadrados assim no grupo 2, que compreende estirpes dos serótipos 1/2c e 3c. Os isolados 2A, 2B, 2C (oriundos da mesma amostra), 3A, 3B, 3C (mesma amostra) e 7A e 7B (mesma amostra) apresentaram os fragmentos ORF2819 e ORF2110, sendo enquadrados assim no grupo 4, que compreende estirpes dos serótipos 4b, 4d e 4e. Estes serótipos são encontrados frequentemente em produtos alimentares, como descrito acima. Os dados relativos ao isolado 8A não são apresentados na figura 30, mas neste caso foi apenas amplificado o gene *prs*, provando que a estirpe pertence ao género *Listeria*. Não foi possível por este método determinar o serogrupo do isolado, apesar de se saber que pertence à espécie *L. monocytogenes* devido aos testes clássicos de identificação realizados anteriormente.

Pelo PCR Multiplex verificou-se que os vários isolados de uma mesma amostra são semelhantes entre si, pertencendo pelo mesmo ao mesmo grupo, se não for também ao mesmo serótipo. No entanto por este método não é possível confirmar o serótipo individualmente.

### Susceptibilidade antimicrobiana

Uma vasta gama de fármacos é activa contra *L. monocytogenes in vitro*, mas *in vivo* é esperada uma eficiência inferior. Este facto pode ser devido a factores como: a incidência da doença em pacientes imunocomprometidos ou em faixas etárias específicas, em que a susceptibilidade a antibióticos é diferente do comum; a localização da bactéria no interior das células do hospedeiro (nomeadamente nos macrófagos) dificulta a actuação do antibiótico; diagnóstico tardio que implica o início do tratamento adequado também tardio; ou muitos dos antibióticos utilizados são apenas bacteriostáticos. O conjunto destes factores poderá contribuir para a elevada taxa de mortalidade descrita em infecções por *L. monocytogenes* (Hof, 1991; Jones e MacGowan, 1995). Desta forma, testou-se a susceptibilidade antimicrobiana de 8 isolados de *L. monocytogenes*: um de cada amostra, já que eram todos semelhantes segundo o resultado do PCR Multiplex (Figura 30). Na tabela 6 são apresentados os valores obtidos de CMI em cada isolado para todos os antibióticos estudados, assim como a respectiva interpretação (sensível ou resistente).

A ampicilina e penicilina são fármacos eficazes na inibição de *L. monocytogenes in vitro*, como se observa na tabela 6, tendo sido já demonstrados por alguns autores (Hof, 1991; Jones e MacGowan, 1995). Contudo, *in vivo* a eficácia nem sempre é a mesma observada *in vitro*. O efeito bacteriostático destes  $\beta$ -lactâmicos e o facto de a bactéria ser intracelular tem grande peso na escolha do tratamento. Assim, a monoterapia não é frequentemente utilizada, sendo necessário a conjugação com outro antibiótico. Para um efeito bactericida é descrita a conjugação da ampicilina com um aminoglicosídeo, normalmente a gentamicina. Esta é usualmente a terapia clínica de primeira escolha para muitas manifestações de listeriose. A gentamicina *in vitro* também demonstra bons resultados (Tabela 6) mas como monoterapia *in vivo* o mesmo já não se sucede. Com a estreptomicina, outro aminoglicosídeo, acontece o mesmo. No entanto, já foram detectadas resistências por parte do microrganismo a estes dois últimos antibióticos (Hof, 1991; Jones e MacGowan, 1995; Conter *et al.*, 2009; Alonso-Hernando *et al.*, 2011).

Trimetoprim-sulfametoxazol, também conhecido como co-trimoxazole, é uma associação de dois antibióticos eficaz contra o patogénico *in vitro* (Tabela 6), mas também

cl clinicamente. É normalmente a terapia de segunda escolha no tratamento de vários tipos de listeriose (Spitzer e Hammer, 1986; Hof, 1991; Jones e MacGowan, 1995; Alonso-Hernando *et al.*, 2011).

A vancomicina tem um efeito inibitório em testes de susceptibilidade à bactéria (Tabela 6), mas *in vivo* é variável consoante o tipo de infecção e forma de administração. É frequentemente utilizado no tratamento de bacterémias ou grávidas com a infecção (Hof, 1991; Jones e MacGowan, 1995; Alonso-Hernando *et al.*, 2011).

A eritromicina tem uma boa actividade *in vitro* e há também casos de sucesso como monoterapia em pacientes, por exemplo, no tratamento de bacterémias ou grávidas doentes (Jones e MacGowan, 1995; Alonso-Hernando *et al.*, 2011). Na tabela 6, a susceptibilidade do patogénico a este fármaco aparece como “intermédia”, já que a CMI observada foi um pouco acima do limite para a sensibilidade segundo a escala utilizada.

A tetraciclina e a rifampicina têm também, geralmente, boa actividade contra *L. monocytogenes*, como comprovado pela tabela 6. A rifampicina é conhecida pela sua excelente capacidade de absorção nos tecidos e células, inibindo o patogénico a nível intracelular. A tetraciclina, eritromicina e rifampicina são utilizados como monoterapias alternativas em caso de alergia aos  $\beta$ -lactâmicos (Jones e MacGowan, 1995; Alonso-Hernando *et al.*, 2011).

A ciprofloxacina, uma quinolona, tem uma boa absorção a nível celular e dos tecidos. No entanto, nem sempre demonstra boa actividade em testes de susceptibilidade em *L. monocytogenes*: pode inibir o patogénico, mas este não é tão susceptível ao mesmo como as bactérias Gram negativas. (Hof, 1991; Jones e MacGowan, 1995; Alonso-Hernando *et al.*, 2011). Pela tabela 6, demonstrou eficácia devido aos baixos valores de CMI, apesar de não existir um intervalo para interpretação de susceptibilidade.

O cloranfenicol nem sempre parece ser a melhor escolha. Há casos relatados de eficácia, assim como de resistência (Hof, 1991; Jones e MacGowan, 1995; Alonso-Hernando *et al.*, 2011). Pela tabela 6, a susceptibilidade dos isolados adquiridos mostrou-se intermédia, não sendo definitivamente o mais indicado neste caso.

Embora não exista um intervalo para interpretação de susceptibilidade na nitrofurantoína, esta mostrou fraca actividade contra o patogénico em questão, já que os valores de CMI observados são bastante elevados. A sua fraca difusão pelos tecidos e células também indica que não será a melhor opção para uma bactéria maioritariamente intracelular (Sousa, 2005).

Os resultados apresentados estão em concordância com estudos semelhantes já realizados (Hof, 1991; Aureli *et al.*, 2003), apesar de exibirem valores inferiores de CMI comparando com estudos publicados por Conter e seus colaboradores (2009).

**Tabela 6.** CMI obtida para cada isolado e referente interpretação em relação a todos os antibióticos analisados.

Classe	Antibiótico	Interpretação <sup>1,2</sup>		CMI (µg/mL) dos isolados e interpretação							
		Sensível (S)	Resistente (R)	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A
Penicilinas	Ampicilina <sup>1</sup>	≤ 2	≥ 4	<0,125 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	<0,125 (S)	<0,125 (S)	<0,125 (S)	0,5 (S)	<0,125 (S)
	Penicilina G <sup>1</sup>	≤ 2	≥ 4	<0,125 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)	<0,125 (S)	<0,125 (S)	<0,125 (S)	0,5 (S)	<0,125 (S)
Glicopeptídeos	Vancomicina <sup>1</sup>	≤ 4	≥ 32	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)
Aminoglicosídeos	Gentamicina <sup>1</sup>	≤ 4	≥ 16	1 (S)	2 (S)	0,25 (S)	1 (S)	1 (S)	1 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)
	Estreptomicina <sup>1</sup>	-	≥ 32	8 (S)	16 (S)	4 (S)	16 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)
Macrólidos	Eritromicina <sup>1</sup>	≤ 0,5	≥ 8	1 (I)	1 (I)	2 (I)	1 (I)	1 (I)	1 (I)	1 (I)	1 (I)
Tetraciclinas	Tetraciclina <sup>1</sup>	≤ 4	≥ 16	2 (S)	2 (S)	1 (S)	2 (S)	2 (S)	2 (S)	1 (S)	2 (S)
Fluorquinolonas	Ciprofloxacina	-	-	2	2	2	2	2	2	1	2
Nitrofurantoínas	Nitrofurantoína	-	-	64	64	64	64	64	64	64	128
Fenóis	Cloranfenicol <sup>1</sup>	≤ 8	≥ 32	16 (I)	16 (I)	16 (I)	16 (I)	16 (I)	16 (I)	8 (S)	16 (I)
Ansamicinas	Rifampicina <sup>1</sup>	-	≥ 2	0,5 (S)	1 (S)	0,5 (S)	<0,125 (S)	0,25 (S)	0,25(S)	0,5 (S)	<0,125 (S)
-	Trimetoprim-sulfametoxazole <sup>2</sup>	≤ 2	≥ 4	0,016 (S)	0,032 (S)	0,032 (S)	0,023 (S)	0,023 (S)	0,023 (S)	0,016 (S)	0,023 (S)

<sup>1</sup> Interpretação de acordo com Almeida (2010). <sup>2</sup> Interpretação baseada no manual do ε-teste (bioMérieux, 2011)

## Conclusões Gerais

Um elevado número de microrganismos pode ser detectado nas contagens totais efectuadas em alimentos, mas a maioria não é patogénica para o ser humano.

Nas alfaces foram observadas diferenças significativas em amostras adquiridas em supermercados, as quais possuíam contagens *E. coli* mais baixas do que as dos restantes estabelecimentos. Verificou-se que 47,5 % da população analisada tinha contaminação fecal e 15 % era portadora de *L. monocytogenes*.

Nos ananases foram encontradas diferenças entre amostras adquiridas em hipermercados e em supermercados sendo as contagens de *Enterobacteriaceae* superiores para o segundo grupo de estabelecimentos. Relativamente aos países de origem foram verificadas contagens superiores em amostras provenientes do Equador, para o mesmo grupo de bactérias, comparativamente às dos restantes países. Apenas 5 % das amostras continham contaminação fecal e 2,5 % eram portadoras de *L. monocytogenes*.

Nas meloas foi observada uma maior contagem de microrganismos totais em amostras adquiridas no pequeno retalho comparativamente com as adquiridas em hipermercados. As amostras mais contaminadas eram provenientes de Marrocos. Não foram encontradas *E. coli*, nem *L. monocytogenes*.

No geral, as cascas dos frutos demonstraram um menor valor de microrganismos totais em comparação com as folhas da alface. O mesmo se sucedeu quanto às contagens de *Enterobacteriaceae*, nas quais os ananases apresentaram os valores inferiores.

Foram isolados *Staphylococcus* coagulase positiva nos vários produtos hortofrutícolas com características semelhantes e nenhum demonstrou ser multirresistente a antibióticos.

As estirpes de *L. monocytogenes* isoladas pertenciam aos serogrupos 2 (1/2c ou 3c) e 4 (4b, 4d ou 4e) e nenhuma mostrou ser resistente aos fármacos habitualmente utilizados na terapia de listeriose.

Os perigos biológicos podem ocorrer em qualquer fase da cadeia alimentar, desde a produção primária até chegar ao consumidor. Portanto, todas as etapas pertencentes ao percurso dos géneros alimentícios devem ser devidamente controladas, com o intuito de proteger as populações dos possíveis perigos e respectivas consequências. Para isto, todos os intervenientes da cadeia alimentar devem interagir de uma forma transparente e efectiva, no sentido de prevenir ou controlar essas situações. No caso dos frutos frescos, normalmente consumidos crus, as boas práticas agrícolas e condições higiénicas de produção, colheita,



transporte, armazenamento e distribuição devem imperar. O transporte de organismos patogénicos nestes frutos é possível, como verificado ao longo deste trabalho.

Quanto aos países originários dos produtos hortofrutícolas, Comitês do *Codex Alimentarius* tentam harmonizar as normas e códigos internacionais. Tais documentos sublinham a aplicação de boas práticas agrícolas e de higiene na produção primária e posterior manipulação dos produtos. O uso de matéria orgânica apropriada, água tratada para irrigação ou lavagem, higiene durante o manuseamento e transporte, incluindo a limpeza do equipamento de colheita e veículos e a eliminação de insectos em todas as etapas são exemplos das boas práticas recomendadas.

A avaliação da presença de microrganismos potencialmente patogénicos, originários de diversos locais, pode conceder informação valiosa sobre o tipo de produção agrícola praticada em cada local e os riscos associados para o consumidor. Isto poderia promover a implementação de sistemas de diagnóstico e programas de vigilância, auxiliando na identificação e prevenindo possíveis fontes de toxi-infecções alimentares.

## Trabalho Futuro

Como trabalho futuro é proposta a avaliação da presença de genes determinantes da produção de enterotoxinas nos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, de forma a inferir sobre a sua capacidade de causar intoxicações pelo consumo dos produtos hortofrutícolas estudados.

Poderia ser interessante estudar a caracterização microbiológica de alfaces sem qualquer tipo de tratamento e simultaneamente, a partir dessas amostras, realização do mesmo estudo após lavagem com água, vinagre, lixívia ou outro produto desinfectante de uso doméstico, de forma a avaliar a redução microbiana após os tratamentos habituais utilizados no legume consumido cru.

Outra proposta consiste na inoculação de bactérias patogénicas na casca de ananases e meloas para verificar o tempo de sobrevivência e também o que acontece ao interior do fruto após o processo de descasque de um produto contaminado.

Realização de um estudo semelhante ao deste trabalho em frutos de casca lisa, nomeadamente o melão, de forma a comparar se efectivamente as cascas lisas e rugosas têm diferenças acentuadas na carga microbiana transportada.



## Bibliografia

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology* **123**:121–129.
- Adams, M.R., Moss, M.O. 2008. Food Microbiology, r. Edition. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 463.
- AFNOR Bio 12/9-07/02 (2002). VIDAS *Listeria monocytogenes*. Association française de Normalisation (AFNOR). França.
- Agüero, M.V., Ponce, A.G., Moreira, M.R., Roura, S.I. 2011. Lettuce quality loss under conditions that favor the wilting phenomenon. *Postharvest Biology and Technology* **59** (2):124-131.
- Aires de Sousa, M., Sanches, I.S., van Belkum, A., van Leeuwen, W., Verbrugh, H., Lencastre, H. 1996. Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Portuguese Hospitals by Multiple Genotyping Methods. *Microbial Drug Resistance* **2** (3):331-41.
- Almeida, G. 2010. *Listeria monocytogenes* in cheese : occurrence, sources of contamination, control, and risks to public health [Tese de Doutoramento]. Porto, 153. Disponível: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. 2011. Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* (doi: 10.1016/j.foodcont.2011.06.006).
- Altekruse, S.F., Cohen, M.L., Swerdlow, D.L. 1997. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* **3** (3):285-93.
- Andersen, B., Thrane, U. 2006. Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins. *Adv Exp Med Biol* **571**:137-52.
- Anónimo. 2000a. Livro Branco Sobre a Segurança dos Alimentos. Comissão das Comunidades Europeias. Bruxelas.
- Anónimo. 2000b. Optimização da Qualidade e Redução de Custos na Cadeia de Distribuição de Produtos Hortofrutícolas Frescos - Manual de Boas Práticas: Alface. Sonae Distribuição, ESB-UCP, Portucel Embalagem, IDARN, DRAEDM.
- Anónimo. 2002. Risk Profile on the Microbiological Contamination of Fruits and Vegetables Eaten Raw. Scientific Committee on Food, European Commission.
- Anónimo. 2005. Detection and Enumeration of *Enterobacteriaceae*. Normal Standard Method. Health Protection Agency.
- Anónimo. 2011. Presentation and Evaluation of Previous Epidemiological Findings regarding the EHEC/HUS O104:H4 Outbreak, May/June 2011, Robert Koch Institute, pp. 31.
- Aureli, P., Ferrini, A.M., Mannoni, V., Hodzic, S., Wedell-Weergaard, C., Oliva, B. 2003. Treatment of *Listeria monocytogenes* Infection with Trimethoprim-Sulfamethoxazole: Case Report and Review of the Literature. *International Journal of Food Microbiology* **83**:325-330.
- Azevedo, I., Regalo, M., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs, P.A. 2005. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control* **16** (2):121-124.
- Baker, H. 1980. Árvores de Fruto: das macieiras e pereiras às figueiras e pessegueiros; pequenas fruteiras, do morangueiro à videira, 3ª Edição. Publicações Europa América, Sintra, pp. 271.

- Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A., Rico, D., Barat, J. 2007. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology* **18**:373-386.
- Bartholomew, D.P., Paull, R.E., Rohrbach, K.G. 2003. The Pineapple: Botany, Production and Uses, CAB International, Oxon, UK, pp.
- Behrsing, J., Jaeger, J., Horlock, F., Kita, N., Franz, P., Premier, R. 2003. Survival of *Listeria innocua*, *Salmonella salford* and *Escherichia coli* on the surface of fruit with inedible skins. *Postharvest Biology and Technology* **29** (3):249-256.
- Beuchat, L.R. 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review, WHO/FAO, pp. 49.
- Bezanson, G.S., MacInnis, R., Potter, G., Hughes, T. 2008. Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology* **127**:37-42.
- bioMérieux, 2011. "bioMérieux: ETest Products". Disponível: [http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_22](http://www.biomerieux-diagnostics.com/servlet/srt/bio/clinical-diagnostics/dynPage?doc=CNL_CLN_PRD_G_PRD_CLN_22) [Data de consulta: 10/10/10].
- Blostein, J. 1991. An outbreak of *Salmonella javiana* associated with consumption of watermelon. *J. Environ. Health* **56**:29-31.
- Bou, G. 2007. Minimum Inhibitory Concentration (CMI) Analysis and Susceptibility Testing of MRSA. Em: Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols (Y. Ji), Humana Press, Nova Jersey, pp. 29-50.
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Garci'a-Gimeno, R.M., Zurera, G. 2008. Growth of *Listeria monocytogenes* on shredded, ready-to-eat iceberg lettuce. *Food Control* **19** (5):487-494.
- CDC. 2007a. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- 10 States, 2006. In *Morbidity and mortality weekly report*: Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC. 2007b. *Salmonella* Oranienburg Infections Associated with Fruit Salad Served in Health-Care Facilities — Northeastern United States and Canada, 2006. In *Morbidity and mortality weekly report*: Centers for Disease Control and Prevention.
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2011. "Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Rocky Ford Cantaloupes from Jensen Farms". Disponível: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/listeriosis/091411.html> [Data de consulta: 15/09/11].
- CE, Comissão Europeia. 1996. "A Comissão Europeia Decide Proteger Nomes de Produto Agroalimentares". Disponível: <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=IP/96/153&format=HTML&aged=0&language=PT&guiLanguage=en> [Data de consulta: 01/08/10].
- CLSI. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Seventeenth Information Supplement M100-S17, Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, pp. 177.
- Conter, M., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Ianieri, A. 2009. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **128**:497-500.
- Cordano, A.M., Jacquet, C. 2009. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. *International Journal of Food Microbiology* **132** (2-3):176-179.

- Cordenunsi, B.R., Nascimento, J.R.O.,Lajolo, F.M. 2003. Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage. *Food Chemistry* **83** (2):167-173.
- De Roever, C. 1998. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *Food Control* **9** (6):321-347.
- Delaquis, P., Bach, S.,Dinu, L.D. 2007. Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables. *Journal of Food Protection* **70** (8):1966-74.
- delRosario, B.A.,Beuchat, L.R. 1995. Survival and growth of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cantaloupe and watermelon. *J. Food Prot.* **58**:105-107.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C.,Martin, P. 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **42** (8):3819-22.
- Drusch, S.,Ragab, W. 2003. Mycotoxins in Fruits, Fruit Juices, and Dried Fruits. *Journal of Food Protection* **66** (8):1514-1527(14).
- Dutta, G.N., Gogoi, J.,Buragohain, J. 2001. Inactivation of chloramphenicol by *Staphylococcus aureus* biotype C from humans and animals. *The Indian Journal of Medical Research* **113**:11-13.
- El-Assi, N.M., Alsmeirat, N.,Alhadidi, N. 2011. Determination of the Optimum Harvest Date for ‘Magenta’ Charentais Melon (*Cucumis melo* L.) Fruit in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* **7** (1):32-43.
- Farber, J.M.,Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews* **55** (3):476-511.
- FDA, U.S. Food and Drug Administration. 2009. "Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, pH Values of Various Foods". Disponível: <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm122561.htm> [Data de consulta: 03/03/09].
- Franz, E., van Diepeningen, A.D., de Vos, O.J.,van Bruggen, A.H.C. 2005. Effects of cattle feeding régime and soil management type on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and previous *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* in manure, manure-amended soil, and previous lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:6165–6174.
- Ghenghesh, K.S., Belhaj, K., El-Amin, W.B., El-Nefathi, S.E.,Zalmum, A. 2005. Microbiological quality of fruit juices sold in Tripoli-Libya. *Food Control* **16** (10):855-858.
- Golden, D.A., Rhodehamel, J.,Kautter, D.A. 1993. Growth of *Salmonella* spp. in cantaloupe, watermelon, and honeydew melons. *Journal of Food Protection* **56** (3):194-196.
- Gram, L. 2004. How to meet an FSO – Control of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish industry. *Mitt. Lebensm. Hyg.* **95**:59–67.
- Hawkey, P.M. 1986. Resistant bacteria in the normal human flora. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **18**:133-139.
- Hayward, A., Knott, F., Petersen, I., Livermore, D.M., Duckworth, G., Islam, A.,Johnson, A.M. 2008. Increasing Hospitalizations and General Practice Prescriptions for Community-onset Staphylococcal Disease, England. In *Emerging Infectious Diseases: Centers for Diseases Control and Prevention*.
- Hof, H. 1991. Therapeutic Activities of Antibiotics in Listeriosis. *Infection* **19** (4):S229-S233.
- Houang, E., Bodnaruk, P.,Ahmet, Z. 1991. Hospital green salads and the effects of washing them. *J Hosp Infect* **17** (2):125-31.
- Hu, H., Mural, R.J.,Liebman, M.N. 2008. Biomedical informatics in translational research, Artech House, Inc., USA, pp. 264.

- Hui, Y.H., Kitts, D., Stanfield, P.S. 2001. Foodborne Disease Handbook: Seafood and environmental toxins, Marcel Dekker, Inc, New York, USA, pp.
- ISO 4833. 2003. ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 °C. International Organization for Standardization (ISO). Suíça.
- ISO 6579. 2002. ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization (ISO). Suíça.
- ISO 6888-1. 1999. ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) -- Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium. International Organization for Standardization (ISO). Suíça.
- ISO 11290-1. 2004b. ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Listeria monocytogenes*. International Organization for Standardization (ISO). Suíça.
- ISO 16649-2. 2001. ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive-*Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide. International Organization for Standardization (ISO). Suíça.
- ISO 21528-2. 2004a. ISO. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of *Enterobacteriaceae* - Part 2: Colony-count method. International Organization for Standardization (ISO). Suíça.
- Jaykus, L.A. 1997. Epidemiology and Detection as Options for Control of Viral and Parasitic Foodborne Disease. In *Emerging Infectious Diseases*: Centers for Disease Control and Prevention.
- Jones, E.M., MacGowan, A.P. 1995. Antimicrobial Chemotherapy of Human Infection due to *Listeria monocytogenes*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **14** (3):165-175.
- Kaferstein, F.K., Motarjemi, Y., Bettcher, D.W. 1997. Foodborne disease control: a transnational challenge. In *Emerging Infectious Diseases*: Centers for Diseases Control and Prevention.
- Klugman, J. 2010. The Real Wealth of Nations: Pathways to Human Development, Human Development Report 2010, United Nations Development Programme, Nova Iorque, pp. 238.
- Kourkoutas, D., Elmore, J.S., Mottram, D.S. 2006. Comparison of the volatile compositions and flavour properties of cantaloupe, Galia and honeydew muskmelons. *Food Chemistry* **97** (1):95-102.
- Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* **2** (1):63-76.
- Leadbetter, J.R. 2005. Environmental microbiology, Elsevier Inc., Reino Unido, pp. 528.
- Lin, C., Fernando, S.Y., Wei, C. 1996. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *E. coli* 0157:H7 in vegetable salads. *Food Control* **7** (3):135-140.
- Lopes, A., Simões, A.M. 2006. Produção Integrada em Hortícolas, Família das Asteráceas - Alface, Direção-Geral de Protecção das Culturas, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e Das Pescas, Oeiras, pp. 93.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology* **92** (1):15-33.

- Montville, T.J., Matthews, K.R. 2008. Food microbiology: an introduction, n. Edition. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 428.
- Núñez-Palenius, H.G., Huber, D.J., Klee, H.J., Cantliffe, D.J. 2007. Fruit ripening characteristics in a transgenic 'Galia' male parental muskmelon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus* Ser.) line. *Postharvest Biology and Technology* **44**:95-100.
- Oliveira, M., Usall, J., Viñas, I., Anguera, M., Gatiús, F., Abadias, M. 2010. Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology* **27**:679-684.
- Orriss, G.D. 1997. Animal Diseases of Public Health Importance. In *Emerging Infectious Disease: Centers for Diseases Control and Prevention*.
- Palavecino, E. 2007. Clinical, Epidemiological, and Laboratory Aspects of Methicillin-Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections. Em: Methicillin - Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Protocols (Y. Ji), Humana Press, Nova Jersey, pp. 1-20.
- Parish, M.E., Beuchat, L.R., Suslow, T.V., Harris, L.J., Garrett, E.H., Farber, J.N., Busta, F.F. 2003. Methods to Reduce/Eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2**:161-173.
- Penteado, A.L., Leitão, M.F.F. 2004. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology* **92** (1):89-94.
- Pereira, V., Lopes, C., Castro, A., Silva, J., Gibbs, P., Teixeira, P. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. *Food Microbiology* **26**:278-282.
- Pommerville, J.C. 2006. Alcamo's Fundamentals of Microbiology, Jones and Bartlett Publishers, London, UK, pp.
- Portaria nº 631/2009. 2009. Ministérios do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Diário da República nº 111, Série I. Portugal.
- Rajvanshi, A. 2010. Bacterial Load on Street Vended Salads in Jaipur City, India. *Internet Journal of Food Safety* **12**:136-139.
- Rangel, J.M., Sparling, P.H., Crowe, C., Griffin, P.M., Swerdlow, D.L. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. In *Emerging Infectious Diseases: Centers for Diseases Control and Prevention*.
- Rezende, A.C.B., de Castro, M.F.P.M., Porto, E., Uchima, C.A., Benato, E., Penteado, A.L. 2009. Occurrence of *Salmonella* spp. in persimmon fruit (*Diospyros kaki*) and growth of *Salmonella enteritidis* on the peel and in the pulp of this fruit. *Food Control* **20** (11):1025-1029.
- Richardson, J.F., Noble, W.C., Marples, R.R. 1992. Species Identification and Epidemiological Typing of the Staphylococci. Em: Identification Methods in Applied and Environmental Microbiology (R. G. Board, F. A. Skinner), Society for Applied Bacteriology, Londres, pp. 193-215.
- Sagoo, S.K., Little, C.L., Ward, L., Gillespie, I.A., Mitchell, R.T. 2003. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of Salmonellosis. *Journal of Food Protection* **66**:403-409.
- Schierack, P., Walk, N., Reiter, K., Weyrauch, K.D., Wieler, L.H. 2007. Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology* **153** (11):3830-7.
- Schwabe, M., Notermans, S., Boot, R., Tatini, S.R., Krämer, J. 1990. Inactivation of staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. *International Journal of Food Microbiology* **10** (1):33-42.



- Scott, L., McGee, P., Sheridan, J.J., Earley, B., Leonard, N. 2006. A comparison of the survival in feces and water of *Escherichia coli* O157:H7 grown under laboratory conditions or obtained from cattle feces. *Journal of Food Protection* **69**:6–11.
- Sekiguchi, J., Fujino, T., Araake, M., Toyota, E., Kudo, K., Saruta, K., Yoshikura, H., Kuratsuji, T., Kirikae, T. 2006. Emergence of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in tuberculosis wards. *Journal of Infection and Chemotherapy* **12** (1):47-50.
- Sergelidis, D., Abraham, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, P., Genigeorgis, C. 1997. Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *International Journal of Food Microbiology* **34** (2):171-177.
- Shaw, W.V., Bentley, D.W., Sands, L. 1970. Mechanism of Chloramphenicol Resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology* **103** (3):1095-1105.
- Smith, S.M., Eng, R.H.K., Tecson-Tumang, F. 1988. Ciprofloxacin Therapy for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections or Colonizations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33** (2):181-184.
- Soriano, J.M., Rico, H., Moltó, J.C., Mañes, J. 2001. Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiology* **18** (2):159-163.
- Sousa, J.C. 2005. Manual de Antibióticos Antibacterianos, Fundação Fernando Pessoa, Porto, pp. 686.
- Spitzer, P.G., Hammer, S.M. 1986. Treatment of *Listeria monocytogenes* Infection with Trimethoprim-Sulfamethoxazole: Case Report and Review of the Literature. *Reviews of Infectious Diseases* **8** (3):427-430.
- Stepansky, A., Kovalski, I., Perl-Treves, R. 1999. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. *Plant Systematics & Evolution* **217**:313-333.
- Stoeppler, M., Wolf, W.R., Jenks, P.J. 2004. Reference materials for chemical analysis: certification, availability, and proper usage, Wiley-VCH, Alemanha, pp. 217.
- Sussman, M. 1997. *Escherichia coli*: mechanisms of virulence, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.
- Tauxe, R.V. 1997. Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. In *Emerging Infectious Diseases*: Centers for Diseases Control and Prevention.
- Tenover, F.C. 1999. Implications of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection* **43** (Supplement 1):S3-S7.
- Uchima, C.A., de Castro, M.F.P.M., Gallo, C.R., Rezende, A.C.B., Benato, E.R., Penteado, A.L. 2008. Incidence and growth of *Listeria monocytogenes* in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. *International Journal of Food Microbiology* **126** (1-2):235-239.
- Viswanathan, P., Kaur, R. 2001. Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **203** (3):205-213.
- WHO/FAO. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. In *Microbiological Risk Assessment Series*.
- Zhang, K., Sparling, J., Chow, B.L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D.L., Gregson, D.B., Louie, T., Conly, J.M. 2004. New Quadriplex PCR Assay for Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance and Simultaneous Discrimination of *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology* **42** (11):4947-55.