

Universidade do Algarve
Instituto Superior de Engenharia

**Qualidade e degradação de fruta minimamente
processada comercializada no Algarve**

Joana Filipa Gonçalves Rodrigues da Silva Lopes

Trabalho realizado para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia dos Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutora Célia Quintas

Doutora Carla Nunes

Faro, 2014

Universidade do Algarve
Instituto Superior de Engenharia

**Qualidade e degradação de fruta minimamente
processada comercializada no Algarve**

Joana Filipa Gonçalves Rodrigues da Silva Lopes

Trabalho realizado para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia dos Alimentos

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Doutora Célia Maria Brito Quintas

Doutora Carla Alexandra Nunes

Faro, 2014

Qualidade e degradação de fruta minimamente processada comercializada no Algarve

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

(Joana Filipa Gonçalves Rodrigues da Silva Lopes)

©2014 Joana Filipa Gonçalves Rodrigues da Silva Lopes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível devido ao apoio e disponibilidade de várias entidades/pessoas, às quais gostaria de agradecer:

À Universidade do Algarve, Instituto Superior de Engenharia, que proporcionou as condições físicas necessárias para a realização deste trabalho;

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) através projeto PTDC/AGR-ALI/111687/2009 “Novas abordagens para o controlo da contaminação por microrganismos patogénicos e aumento da segurança e qualidade da fruta fresca cortada” no qual se incluiu o trabalho e através do qual o trabalho foi financiado;

Pela orientação prestada durante o período do trabalho, à Doutora Célia Quintas, por toda a atenção e disponibilidade que sempre dedicou de forma simpática e positiva, sempre encorajando e motivando para avançar;

À Doutora Carla Nunes por ter aceitado coorientar este trabalho;

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia por toda a disponibilidade e ajuda oferecidas;

Ao professor Doutor Eduardo Esteves e ao professor Doutor Jaime Aníbal pelos conhecimentos adquiridos ao longo de todos estes anos de Universidade, pois sem eles também não seria possível a realização deste trabalho;

Aos meus amigos que nos momentos mais difíceis estiveram lá para confortar e dar a força necessária para continuar, especialmente à Eng^a Susana Barros, à Eng^a Débora Pereira, ao Fábio Mota, à Joana Dias e à Eng^a Cíntia Saúde;

Aos meus amigos, Humberto Brito e Telma Guerreiro, por serem os meus Mestres e me iluminarem o caminho;

Aos meus pais e avós pela ajuda, amor, carinho e apoio dado ao longo desta etapa e pela vida fora.

A todos Muito Obrigada!

Resumo

O consumo de frutas e vegetais minimamente processados tem aumentado nas últimas décadas devido à alteração das preferências e do estilo de vida dos consumidores. Neste tipo de alimentos, em que as barreiras protetoras naturais são destruídas, o risco de contaminação por microrganismos patogênicos aumenta, o que pode constituir um perigo para a saúde pública. O objetivo do presente trabalho foi estudar a qualidade microbiológica de fruta minimamente processada comercializada no Algarve. Foram adquiridas 42 amostras de embalagens individuais de maçã, abacaxi, manga, mamão/papaia, melão, meloa *cantaloupe* e meloa gália. Os parâmetros microbiológicos avaliados foram: microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, bactérias ácido-lácticas (BAL), enterobactérias (coliformes e *Escherichia coli*) e fungos. Estes parâmetros foram também estudados na fruta em que o prazo de validade foi ultrapassado.

As amostras foram analisadas de acordo com metodologias *standard* (ISO) e utilizou-se *Chromocult Agar* para enumerar coliformes e *E. coli*. Foi também estudada a presença dos microrganismos patogênicos *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii* e *Staphylococcus aureus*.

Na fruta estudada, o número de microrganismos mesófilos e psicrotróficos variou entre 3,3 e 10,7 Log UFC/g, as BAL apresentaram-se entre 3,1 Log UFC/g e 9,0 Log UFC/g e os fungos foram detetados em valores médios de 4,8 Log UFC/g. 97,6 % das porções de fruta continha coliformes e detetou-se *S. aureus* e *C. sakazakii* num baixo número de amostras. Todavia, *Salmonella sp.*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, não foram isoladas.

De acordo com os regulamentos da Comissão Europeia (2073/2005 e 1441/2007), as amostras analisadas satisfaziam os critérios microbiológicos de segurança e higiene alimentar. No entanto, a presença de coliformes e *S. aureus* alerta para a necessidade de intensificar as boas práticas de higiene durante a produção e acautelar as condições adequadas de refrigeração durante a distribuição e comercialização de fruta minimamente processada.

Palavras-chave: Fruta minimamente processada; Qualidade microbiológica; *Salmonella sp.*; *Listeria monocytogenes*; *Cronobacter sakazakii*; Degradação

Abstract

Minimally processed fresh-cut fruit are ready to eat products very attractive to consumers looking for healthy and convenient meals. Fresh-cut fruits are susceptible to microbial contamination, in any phase of the production or distribution due to the destruction of fruits' natural protective barriers. Additionally, they can be a vehicle for pathogens causing health problems. The aim of the present work was to evaluate the microbiological quality and the main bacterial foodborne pathogens of minimally processed fruit commercialized in the South of Portugal. Forty two fresh-cut fruit individual packs (apple, pineapple, mango, papaya, melon, *cantaloupe* and galia melon) were purchased in supermarkets and analyzed for aerobic mesophilic and psychrotrophic microorganisms, lactic acid-bacteria (LAB), *Enterobacteriaceae* (coliforms and *Escherichia coli*) and fungi. The same number of samples was also studied after their expiration date for the identical microbial groups.

Samples were analyzed according to standard methodologies (ISO) and using *Chromocult* Agar for coliforms and *E. coli*. The safety microbiological parameters studied were *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes*.

The aerobic mesophilic and psychrotrophic biota ranged from 3,3 to 10,7 Log CFU/g. The LAB were present in numbers ranging from 3,1 Log CFU/g to 9 Log CFU/g and fungi were detected in values of 4,8 Log CFU/g. None of the samples studied were positive for the foodborne pathogens *Salmonella* sp., *L. monocytogenes* and *E. coli*. However, 97,6 % of the samples contained coliforms and a low number of them, *C. sakazakii* and *S. aureus*.

According to the regulations of the European Commission (Reg(CE) 2073/2005 and Reg(CE) 1441/2007), the samples analyzed fulfilled the microbiological criteria of food hygiene and safety. However, the presence of coliforms and *S. aureus* indicates the need of increasing of hygienic practices in the fresh-cut fruit production chain and during distribution and retailing as well as maintaining the adequate refrigerating temperatures.

Keywords: Fresh-cut fruit; Microbiological quality; *Salmonella* sp.; *Listeria monocytogenes*; *Cronobacter sakazakii*; Spoilage

Índice de matérias

	Págs.
1. Introdução	1
1.1. Fontes e mecanismos de contaminação de frutas e vegetais	2
Pré-colheita	3
Colheita	4
Pós-colheita	4
1.2. Fruta	6
1.3. pH.....	7
1.4. Deterioração	8
1.5. Surtos de origem alimentar	8
1.6. Infecções alimentares.....	12
<i>Salmonella</i> sp.	12
<i>Listeria monocytogenes</i>	14
<i>Cronobacter sakazakii</i>	15
2. Objetivos	16
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Amostras	17
3.2. Metodologias de análise	20
3.3. Isolamento de bactérias	28
3.4. Manutenção das culturas de bactérias	28
3.5. Identificação molecular das bactérias patogénicas.....	28
3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	30
4. Resultados	35
4.1. Qualidade microbiológica de fruta minimamente processada.....	35
4.2. Qualidade microbiológica de fruta minimamente processada determinada após o prazo de validade	38
4.3. Qualidade microbiológica de fruta minimamente processada antes e depois de expirado o prazo de validade: comparação	42
4.4. Microrganismos patogénicos.....	47
4.5. Determinação do pH.....	52
5. Discussão.....	53

6. Conclusão.....	57
Perspetivas futuras	58
Referências bibliográficas	59
Anexo I – Amostras de fruta minimamente processada.....	66
Anexo II – Meios de cultura.....	68
Anexo III – Comunicação, sob a forma de painel apresentada, no International Food Congress “Novel Approaches in Food Industry” (NAFI 2014) que decorreu em Kusadasi - Turquia de 26 a 29 de Maio de 2014.....	71

Índice de figuras

Figura 1 – Diagrama de fabrico de fruta fresca cortada	2
Figura 2 - Mecanismos pelos quais as frutas e vegetais crus podem contaminar-se com microrganismos patogénicos	3
Figura 3 – Quantidade de frutos frescos consumidos por habitante em Portugal	6
Figura 4 – Grupos de alimentos associados a surtos de origem alimentar, na União Europeia em 2010.....	9
Figura 5 – Principais causadores de surtos veiculados por frutas e vegetais na União Europeia em 2010.....	10
Figura 6 – Fruta minimamente processada utilizada no estudo de avaliação de qualidade microbiológica.....	18
Figura 7 - Fruta minimamente processada fora do prazo de validade utilizada no estudo de avaliação de qualidade microbiológica.....	19
Figura 8 – Contagem e confirmação de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
Figura 9 - Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp., isolamento, identificação e métodos de confirmação.....	23
Figura 10 – Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> , isolamento, identificação e métodos de confirmação	25
Figura 11 – Pesquisa de <i>Cronobacter sakazakii</i> , isolamento, identificação e métodos de confirmação	27
Figura 12 – Parâmetros microbiológicos de maçã minimamente processada determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado	42
Figura 13 - Parâmetros microbiológicos de abacaxi minimamente processado determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado	43
Figura 14 - Parâmetros microbiológicos de manga minimamente processada determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado	43
Figura 15 - Parâmetros microbiológicos de mamão/papaia minimamente processado determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado	44
Figura 16 - Parâmetros microbiológicos de melão minimamente processado determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado	45
Figura 17 - Parâmetros microbiológicos de meloa <i>cantaloupe</i> minimamente processada determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado	46

Figura 18 - Parâmetros microbiológicos de meloa gália minimamente processada determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado	47
Figura 19 - Placa com meio de cultura <i>Baird Parker</i> , com colónias com características de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos	48
Figura 20 - Placa com meio de cultura <i>Brilliance</i>	49
Figura 21 - Placa com meio de cultura Palcam	49
Figura 22 - Placa com meio de cultura DFI.....	50
Figura 23 - Identificação do género <i>Cronobacter</i> por PCR.	51
Figura 24 – Identificação da espécie <i>Cronobacter sakazakii</i> por PCR.	51

Índice de tabelas

Tabela 1 – Fatores que afetam o aumento do número de surtos relacionados com produtos frescos	11
Tabela 2 – Surto relacionado com produtos frescos de 1996 até 2011	12
Tabela 3 - Condições de amplificação para identificação de bactérias do género <i>Salmonella</i> ...	30
Tabela 4 - Condições de amplificação para identificação de bactérias do género <i>Listeria</i> e espécie <i>Listeria monocytogenes</i>	31
Tabela 5 – Condições de amplificação para identificação de bactérias do género <i>Cronobacter</i>	32
Tabela 6 - Condições de amplificação para identificação de bactérias da espécie <i>Cronobacter sakazakii</i>	33
Tabela 7 - Reagentes utilizados na mistura para PCR (Mix) para as 3 bactérias	33
Tabela 8 – Microrganismos aeróbios mesófilos em fruta minimamente processada	35
Tabela 9 – Microrganismos aeróbios psicrotróficos em fruta minimamente processada.....	36
Tabela 10 – Bactérias ácido lácticas em fruta minimamente processada.....	36
Tabela 11 – Fungos em fruta minimamente processada	37
Tabela 12 – Coliformes em fruta minimamente processada	38
Tabela 13 – Microrganismos aeróbios mesófilos em fruta minimamente processada contados após o prazo de validade ter sido ultrapassado.....	39
Tabela 14 – Microrganismos aeróbios psicrotróficos em fruta minimamente processada contados após o prazo de validade ter sido ultrapassado	39
Tabela 15 – Bactérias ácido lácticas em fruta minimamente processada contadas após o prazo de validade ter sido ultrapassado	40
Tabela 16 – Fungos em fruta minimamente processada contados após o prazo de validade ter sido ultrapassado	41
Tabela 17 – Coliformes em fruta minimamente processada contados após o prazo de validade ter sido ultrapassado	41
Tabela 18 – Isolados de microrganismos patogénicos presuntivos nas amostras de fruta minimamente processada analisadas	47
Tabela 19 - Resultados de pH da fruta minimamente processada antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado	52
Tabela 20 – Amostras de fruta minimamente processada, local de aquisição, prazo de validade e respetivas datas de análise.....	66
Tabela 21 – Meios de cultura utilizados.....	68

1. Introdução

A globalização tem afetado a sociedade e alterado os seus hábitos de vida e de alimentação (Santos *et al.*, 2012). O consumo de legumes e fruta minimamente processados tem aumentado continuamente durante as últimas décadas devido à alteração do estilo de vida e das preferências dos consumidores, resultantes da falta de tempo para comprar, preparar e cozinhar alimentos (Alegre *et al.*, 2013). Os produtos minimamente processados não necessitam de preparação e contêm uma grande variedade de vitaminas e minerais importantes para a saúde humana.

As frutas e vegetais minimamente processados são “qualquer fruta fresca, vegetal ou outra combinação destas, que tenha sido fisicamente alterada da sua forma original, mas que se mantém num estado fresco” (IFPA, 2001; Corbo *et al.*, 2010). Estão bastante disponíveis no mercado e são consideradas pelos consumidores produtos saudáveis e seguros para o consumo (Abadias *et al.*, 2012). A fruta é um componente importante para uma dieta saudável, pois contém vitaminas e baixo conteúdo em calorias (Silveira *et al.*, 2013). Vários estudos têm demonstrado que dietas ricas em fruta e vegetais podem reduzir o risco de desenvolver doenças não transmissíveis, como o acidente vascular cerebral e doenças cardíacas. Em 2004 um painel de peritos da Organização de Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou um valor mínimo de ingestão diária de 400 g de frutas e vegetais para prevenir o cancro, a diabetes e a obesidade (Allen *et al.*, 2013).

Quando são minimamente processados, os alimentos são submetidos a uma série de operações que incluem a seleção, a lavagem, a desinfecção, o descascamento, o corte e uma nova lavagem (figura 1). Esta série de operações não assegura a ausência de microrganismos pelo que estes alimentos poderão ser responsáveis por infeções alimentares (Corbo *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2013).

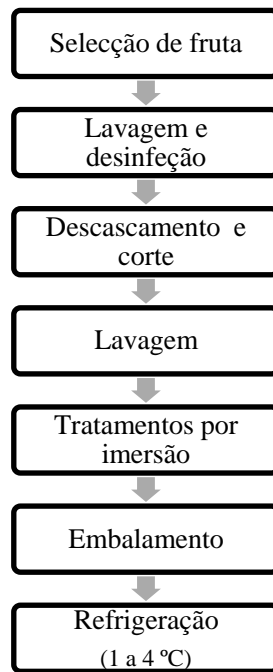


Figura 1 – Diagrama de fabrico de fruta fresca cortada (adaptado de Corbo *et al.*, 2010)

O processamento mínimo de fruta fresca promove uma deterioração física e degradação microbiológica desses produtos que podem resultar numa degradação de cor, textura e sabor, mesmo que seja um processamento ligeiro (Corbo *et al.*, 2010).

1.1. Fontes e mecanismos de contaminação de frutas e vegetais

A maior parte da fruta contém um revestimento externo de cera protetora, que tem como função criar uma barreira contra microrganismos. Contudo, pode existir uma microbiota natural à superfície da fruta, incluindo bactérias (*Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* spp.), fungos (*Aspergillus*, *Penicillium*), Leveduras (*Saccharomyces*, *Candida*), vírus e parasitas. O crescimento de microrganismos patogénicos em qualquer ponto de produção e manuseamento antes e depois da colheita pode ser influenciado por fatores intrínsecos como o pH, e extrínsecos, tais como a temperatura (Corbo *et al.*, 2010).

Os produtos frescos podem ser um meio de transmissão para bactérias, parasitas e vírus patogénicos, capazes de causar doenças. Têm sido reportados alguns casos de microrganismos potencialmente patogénicos de origem alimentar, em vegetais crus e fruta fresca cortada que podem desenvolver-se durante o crescimento, colheita, manuseamento após a colheita e distribuição (Abadias *et al.*, 2008). As bactérias podem ser transferidas da parte exterior da superfície do fruto para as porções de fruta durante

Colheita

Os agentes causadores de doenças podem contaminar alimentos como as frutas e vegetais durante os passos de colheita (recolha, classificação, embalagem e transporte), por contaminação cruzada, em equipamentos da colheita, recipientes de transporte e os próprios veículos de transporte de alimentos. A presença de animais, aerossóis e o uso de água e gelo contaminado pode aumentar os níveis de contaminação da fruta e vegetais (Beuchat, 2002). Nesta fase, o mau manuseamento dos alimentos pode causar lesões, o que leva a um aumento da possibilidade de contaminação e facilita o crescimento de microrganismos patogénicos ou de degradação dos alimentos de origem vegetal. O nível de contaminação durante a colheita é também influenciado pelas condições ambientais como a temperatura, a humidade e o tempo de transporte (Francis *et al.*, 2012).

A adoção de boas práticas de higiene, tanto dos trabalhadores como dos equipamentos utilizados na colheita de frutas e vegetais, contribuirá para a redução de potenciais contaminações de microrganismos patogénicos.

Pós-colheita

Após a colheita, as frutas e os legumes devem beneficiar de uma lavagem à superfície e um rápido arrefecimento de forma a retardar o crescimento de microrganismos de degradação (Barth *et al.*, 2009).

Os passos de pós-colheita incluem o armazenamento, a lavagem, seguido do embalagem e transporte. No caso de frutas ou vegetais minimamente processados ou na produção de sumos são necessárias operações de descasque e corte. Durante esses passos, pode existir uma introdução de microrganismos provenientes dos materiais (utensílios de corte, superfícies contaminadas e outros alimentos) ou por parte dos manipuladores. Por outro lado, os microrganismos que se encontram no solo e/ou em contacto com a fruta durante a colheita permanecem à superfície enquanto a fruta se encontra intacta e saudável, mas se durante as operações de processamento pós-colheita existir algum corte ou degradação, esses microrganismos vão instalar-se na parte interna dos tecidos, ricos em nutrientes e mais sensíveis (Corbo *et al.*, 2010).

Um dos fatores que afetam a qualidade dos produtos minimamente processados é o facto das frutas que são colhidas, continuarem a respirar e a utilizar os açúcares e os ácidos orgânicos disponíveis para produzir dióxido de carbono e etileno. O corte feito

vai aumentar o *stress* induzido, ocorrendo produção de etileno e acelerando a perda de água. A disponibilidade de açúcar pode levar ao aumento e rápido crescimento da contaminação microbiana (Shah e Nath, 2006).

Segundo Strawn, *et al.* (2011), a lavagem é um passo essencial, antes do embalamento para a remoção de contaminantes, incluindo os microrganismos patogénicos em certos frutos tropicais. O mesmo estudo revela que a água quente (60 °C durante 20 minutos) reduz o número inicial de bactérias do género *Salmonella* inoculadas em manga inteira para um valor abaixo do limite de deteção.

De acordo com Silveira *et al.* (2013) e Alegre *et al.* (2013), os processos térmicos são utilizados para garantir a proteção dos alimentos contra os microrganismos patogénicos e de degradação mas, sabe-se que esses processos levam a uma destruição de nutrientes sensíveis ao calor e a alteração da textura, de cor e de sabor. A fruta fresca cortada, fica portanto mais suscetível à colonização e degradação por parte de microrganismos, induzindo alterações indesejadas no sabor, no aroma e na cor.

Na indústria de produtos frescos cortados, tem sido usual o tratamento com cloro como desinfetante, pois tem custos reduzidos, está facilmente disponível e é utilizado há muito tempo (Ramos *et al.*, 2013). Porém, o cloro não garante a eliminação ou mesmo uma redução eficiente ao nível dos microrganismos patogénicos, é corrosivo, é sensível à temperatura, à luz e ao ar, não é permitido em alguns países da Europa e podem ocorrer resistências por parte de esporos bacterianos (Beuchat, 1998; Ramos *et al.*, 2013). Uma exposição prolongada ao vapor do cloro pode causar irritação na pele e afetar as vias respiratórias dos manipuladores (Alegre *et al.*, 2013).

A embalagem em atmosfera modificada (MAP) tem sido utilizada com sucesso juntamente com a refrigeração para frutas frescas inteiras e cortadas como uma estratégia para manter a segurança dos produtos e para aumentar o tempo de prateleira desses alimentos. A MAP utiliza geralmente uma atmosfera interna composta por três tipos de gases (O_2 , CO_2 e N_2), para além do ar numa embalagem selada hermeticamente com permeabilidade adequada (Abadias *et al.*, 2012). Tem como vantagens, estender o tempo de armazenamento do produto fresco entre 50 a 400 % e melhorar a segurança dos alimentos, os quais não adquirem odores desagradáveis. Os produtos frescos cortados apresentam uma maior tolerância a concentrações elevadas de CO_2 do que os alimentos inteiros. No entanto, é necessário um controlo adequado da temperatura, uma formulação de gases diferente para cada alimento e os filmes envolventes podem constituir um perigo para o ambiente (Ramos *et al.*, 2013).

Para controlar a contaminação nas operações de pós-colheita é necessário o uso de água de lavagem de boa qualidade, evitar temperaturas abusivas, evitar contaminações cruzadas nas superfícies e equipamentos de corte e adotar as boas práticas de fabrico e higiene (Barth *et al.*, 2009).

1.2. Fruta

Segundo Abadias *et al.* (2008) nos Estados Unidos, Canadá, Nova Zelândia e vários países da União Europeia, as instituições de saúde pública têm recomendado fortemente o consumo de pelo menos cinco porções de fruta por dia. Em Portugal, de acordo com os dados do INE tem-se assistido a uma diminuição do consumo de fruta nos últimos anos (Figura 3). No período de 2011/2012, o consumo de frutos frescos foi de 76,6 Kg por habitante, mas no período de 2007/2008 o seu consumo por habitante era de 83 Kg (INE, 2012).

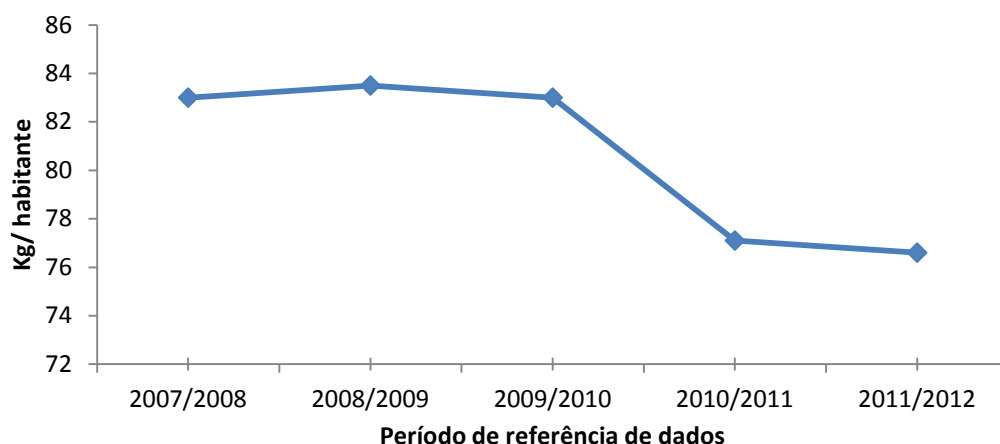


Figura 3 – Quantidade de frutos frescos consumidos por habitante em Portugal (INE, 2012)

Existe uma grande variedade de frutos, com sementes (maçã, pera, melão, melancia, meloa), com caroço (cerejas, pêssegos, ameixas), vermelhos (amoras, framboesas, morangos), tropicais (manga, papaia, abacaxi, mamão, banana) e citrinos (tangerina, laranja, limão). Estes alimentos constituem uma fonte essencial de água, fibra, vitaminas, sais minerais e antioxidantes.

Os frutos têm épocas próprias de maturação, altura em que estão reunidas as condições ideais de colheita. No caso da maçã a sua época habitual é muito extensa, praticamente durante todo o ano, estando fora de época nos meses de Maio e Junho. O melão e a

meloas entram no seu estado de maturação entre os meses de Junho a Setembro (Nunes, 2012).

Quanto mais madura estiver a fruta, mais suscetível se torna a lesões durante o processamento, uma vez que, os tecidos vegetais quando cortados são mais sensíveis à deterioração microbiana. A altura ideal para submeter os frutos a um processamento mínimo, de modo a diminuir os danos do corte, varia dependendo da espécie (Corbo *et al.*, 2010). Durante o processo de amadurecimento, a fibra e os níveis de acidez dos frutos diminuem, o teor de açúcar aumenta devido à transformação do amido em açúcar e a sua textura suaviza. Verifica-se também a alteração da cor, que geralmente passa de verde para uma sombra de amarelos e encarnados e desenvolve-se um aroma característico (Nunes, 2012).

1.3. pH

Na Catalunha, Espanha, Abadias *et al.* (2008) relataram nos seus estudos de qualidade microbiológica de produtos minimamente processados, que a maçã, o pêsego, a laranja, a manga e o ananás continham pequenas populações microbianas de bolores e leveduras, não tendo detetado nenhuma bactéria da família *Enterobacteriaceae*. A explicação para esta situação reside no facto de estas frutas serem mais ácidas do que outros tipos de fruta e também da combinação de um pH baixo e da baixa temperatura, durante o período de armazenamento, o que contribui para inibir o crescimento microbiano.

Frutas como o melão, melancia, papaia e abacate, têm valores de pH elevados, muito próximos dos vegetais. Quando a superfície da fruta é danificada ocorre o desenvolvimento de um gradiente de pH, proporcionando condições de crescimento para bactérias patogénicas (Soliva-Fortuny e Martín-Belloso, 2003).

Segundo Fang *et al.* (2013) e Lamikanra *et al.* (2000) a meloa *cantaloupe* cortada tem um pH considerado, entre 5,2 e 6,7, uma atividade da água elevada, entre 0,97 e 0,99 e é capaz de suportar o crescimento/desenvolvimento de microrganismos patogénicos. Tem sido implicada em diversos casos de surtos de infeções alimentares desde 1990. Em Setembro de 2011, a meloa *cantaloupe* esteve na base de um surto de listeriose, causando 146 doentes e 30 mortos em 28 estados dos EUA.

O ananás pode ser consumido de diversas formas, cortado, em sumo, ou como ingrediente de saladas, sendo o seu maior exportador a Tailândia. Devido ao seu pH

baixo ($\pm 3,8$), as populações de *Salmonella enteritidis* e *E. coli* O157:H7 inoculadas em ananás minimamente processado não aumentaram, após armazenamento a temperaturas de 4, 10 e 20 °C durante 2 dias (Strawn *et al.*, 2011).

Entre os microrganismos, os fungos e as leveduras têm uma vantagem competitiva sobre as bactérias, devido à sua capacidade de crescer em valores de pH mais baixos (2,2 - 5), característicos de grande parte das frutas (Corbo *et al.*, 2010).

1.4. Deterioração

Os alimentos minimamente processados estão sujeitos a uma deterioração mais rápida relativamente aos alimentos inteiros. O crescimento bacteriano e o desenvolvimento de reações bioquímicas nos tecidos vegetais atingidos são considerados responsáveis pela diminuição da qualidade deste tipo de alimentos, pois aceleram a deterioração e aumentam o risco de transmissão de doenças devidas a microrganismos patogénicos de origem alimentar (Manzocco *et al.*, 2011).

O tempo de prateleira recomendado para as frutas e vegetais minimamente processados varia entre os 10 e os 14 dias, dependendo do tipo de fruta, da temperatura a que se encontra armazenada e se foi submetida a algum tipo de tratamento antes ou durante o embalamento (Barth *et al.*, 2009). Após o tempo de vida útil, observam-se sinais de deterioração tais como: descolorações na superfície do alimento, aparecimento de líquidos, perda de humidade, aparecimento de odores desagradáveis alterações ao nível da textura e aparecimento de colónias de microrganismos. Segundo Sapers *et al.* (2001), estudos feitos com meloa *cantaloupe* minimamente processada revelaram uma degradação visual, incluindo a presença de colónias e turbidez no sumo, após 15 dias de armazenamento a 4 °C.

1.5. Surtos de origem alimentar

Em 2010, foram relatados por 24 países da União Europeia um total de 5262 surtos de origem alimentar. Estes surtos causaram 43473 casos de doença em humanos. Destes, 4695 foram internados em hospitais e registadas 25 mortes associadas ao género *Salmonella*, à espécie *Listeria monocytogenes* e a toxinas de *Clostridium botulinum*. França foi o país que reportou mais casos com fortes indícios de surtos em humanos, 1407 casos, enquanto Portugal registou, em 2010, 56 casos de fortes indícios de surtos de origem alimentar (EFSA, 2010).

Relativamente aos agentes patogénicos causadores de surtos, em 2010, *Salmonella* foi responsável por 30,5 % de todos os surtos, seguida por vírus e *Campylobacter* que foram implicados em 15,0 % e 8,9 % dos surtos, respetivamente. Em 30,1 % de todos os surtos, o agente causador era desconhecido e essa proporção foi ligeiramente maior que nos anos anteriores (EFSA, 2010).

A Figura 4 apresenta a distribuição, na União Europeia, dos grupos de alimentos associados a vários surtos de origem alimentar. Os ovos foram responsáveis por 22,1 % de surtos, as refeições de *buffet* por 13,9 %, e as frutas e os legumes e derivados estiveram envolvidos em cerca de 1,3 % e 8,7 % dos surtos alimentares, respetivamente.

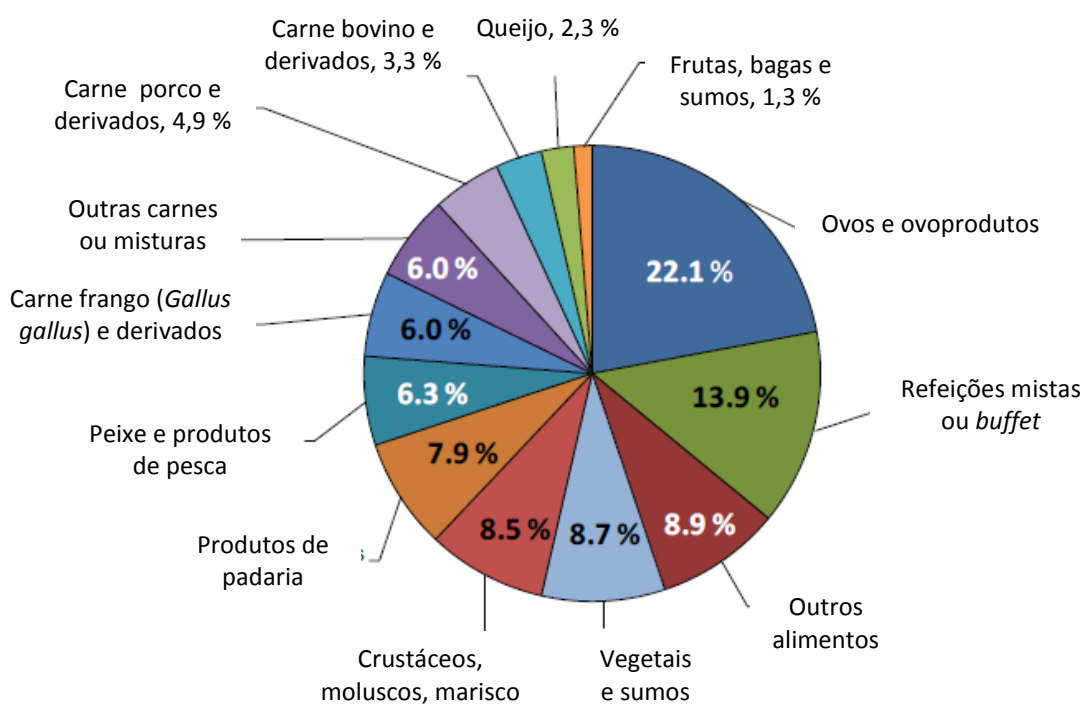


Figura 4 – Grupos de alimentos associados a surtos de origem alimentar, na União Europeia em 2010 (EFSA, 2010). N=698 Nota: Dados de 698 surtos incluindo: Áustria (10), Bélgica (16), Dinamarca (48), Estónia (2), Finlândia (24), França (75), Alemanha (40), Hungria (30), Irlanda (3), Letónia (7), Lituânia (7), Holanda (13), Polónia (118), Portugal (4), Roménia (19), Eslováquia (20), Eslovénia (3), Espanha (196), Suécia (13) e Reino Unido (50).

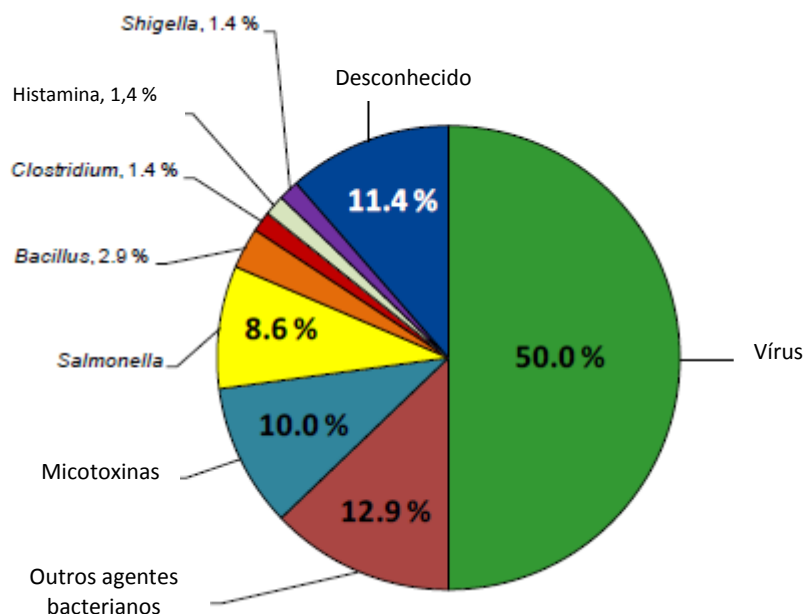


Figura 5 – Principais causadores de surtos veiculados por frutas e vegetais na União Europeia em 2010 (EFSA, 2010)

Na Figura 5 pode observar-se a distribuição dos principais agentes causadores de surtos, veiculados por frutas e vegetais na União Europeia em 2010. Os vírus foram responsáveis por metade dos surtos de origem alimentar causados pela ingestão de frutas e vegetais. *Salmonella* foi responsável por 8,6 % de surtos de origem alimentar e 11,4 % dos agentes patogénicos não foram identificados.

Segundo Ölmez e Kretzschmar (2009), dependendo da estação do ano e do tipo de produtos, as frutas e os vegetais podem conter um elevado nível de contaminação microbiana, cerca de 3 a 7 Log UFC/g, após a sua colheita. Os produtos minimamente processados não são submetidos a nenhum tipo de tratamento que elimine os microrganismos patogénicos antes de serem consumidos. Portanto, os agentes patogénicos poderão estar presentes na altura do consumo, uma vez que se podem inserir em qualquer ponto da cadeia de produção. Desta forma, os produtos frescos podem ser considerados como potenciais veículos de transmissão de microrganismos capazes de originar doenças no ser humano.

Os fatores que mais contribuem para o aparecimento dos produtos frescos como a causa de surtos alimentares estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1 – Fatores que afetam o aumento do número de surtos relacionados com produtos frescos (adaptado de Quintas, 2011)

Alterações na indústria
Intensificação e centralização da produção
Redes de distribuição muito grandes
Introdução de frutas e vegetais minimamente processados
Aumento da importação de frutas e vegetais frescos
Alterações nos hábitos de consumo
Aumento do consumo de refeições fora de casa
Aumento do consumo de saladas
Aumento do consumo de frutas, vegetais e sumos de fruta frescos
Alterações no estilo de vida
Aumento do tamanho da população em risco
Desenvolvimento de novos métodos para identificar e localizar microrganismos patogénicos
Microrganismos patogénicos emergentes com baixas doses de infeção

A Tabela 2 resume os casos de surtos relacionados com alimentos frescos desde 1996.

Tabela 2 – Surtos relacionados com produtos frescos de 1996 até 2011 (Adaptado de Olaimat e Holley, 2012; Strawn *et al.*, 2011; Raybaudi-massilia *et al.*, 2009)

Local	Ano	Patogénico	Produto	Casos (mortes)
Singapura	1996	<i>Salmonella</i> sp.	Ananás fresco cortado	116
USA	2001	<i>Salmonella</i> sp.	Manga crua	16
-	2005	<i>Escherichia coli</i> <i>O157:H7</i>	Salada de frutas	18
Austrália	2006	<i>Salmonella</i> sp.	Papaia fresca cortada	-
USA, Canadá	2006	<i>Salmonella</i> sp.	Salada de frutas	41
Austrália	2006	<i>Salmonella</i> sp.	Meloa <i>Cantaloupe</i>	115
USA	2008	<i>Salmonella</i> sp.	Meloa <i>Cantaloupe</i>	51
USA	2010	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Produtos frescos cortados	10 (5)
USA	2011	<i>Salmonella</i> sp.	Meloa <i>Cantaloupe</i>	20
USA	2011	<i>Salmonella</i> sp.	Papaia	106
USA	2011	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	Meloa <i>Cantaloupe</i>	146 (31)

1.6. Infecções alimentares

As infeções de origem alimentar envolvem, em geral, a ingestão e multiplicação de agentes patogénicos, acompanhadas da invasão dos tecidos e/ou libertação de toxinas (Ferreira e Sousa, 2010). Os microrganismos penetram na mucosa intestinal e multiplicam-se criando focos infecciosos, levando a perdas de líquidos e comprometendo a absorção normal da água e dos nutrientes. As bactérias causadoras de infeções alimentares mais frequentes estão incluídas nos géneros *Salmonella*, *Escherichia* e *Listeria*, entre outras (Raybaudi-Massilia *et al.*, 2009).

Salmonella sp.

As bactérias do género *Salmonella* são bastonetes Gram negativos, anaeróbio facultativo, possuidoras de catalase mas não contém citocromo C (teste de oxidase negativo). Pertencem à família das *Enterobacteriaceae* e a maioria não fermenta lactose

nem sacarose, (Mukhopadhyay e Ramaswamy, 2012). O seu *habitat* está associado ao tubo digestivo dos animais incluindo os seres humanos, sendo amplamente disseminadas na natureza a partir de matérias fecais. Algumas estirpes podem ser responsáveis pela febre tifoide, diarreias e outras podem provocar gastroenterites transmitidas pela água e os alimentos de origem animal (Sant'Ana *et al.*, 2012; Marathe *et al.*, 2012; Kotzekidou, 2013). Uma vez que *Salmonella* é sensível ao calor, é mais predominante em alimentos crus, que contém uma temperatura mínima de segurança interna, contudo os alimentos processados como as carnes e saladas prontas a comer ficam mais suscetíveis a contaminações cruzadas (Mukhopadhyay e Ramaswamy, 2012). De acordo com Penteado *et al.* (2004), *Salmonella* consegue manter-se no interior de uma manga intacta durante os tratamentos de aquecimento e arrefecimento a que é sujeita após a colheita.

Os sintomas gastrointestinais associados a salmoneloses ocorrem, em geral, após um período de incubação de 16 a 18 horas. Os alimentos envolvidos são geralmente os produtos cárneos e os lácteos, embora a infeção possa também pode ser veiculada por portadores assintomáticos que manipulam os alimentos nas fábricas ou nas cadeias de distribuição (Mukhopadhyay e Ramaswamy, 2012). Em Portugal, *Salmonella enteritidis* tem sido a mais detetada nos surtos, sendo a fonte principal de infeção, os ovos (Ferreira e Sousa, 2010). Em 2010, foram confirmados 205 casos de salmonelose em Portugal enquanto na União europeia (EU – 27 países) foram identificados e confirmados 99,020 casos (EFSA, 2010). Segundo a Diretiva da EU (94/65/EC) para a preparação de carnes *Salmonella* sp. deve estar ausente em 10 g. Segundo o regulamento (CE) n° 1441/2007, para frutas e produtos hortícolas pré-cortados (prontos para consumo), *Salmonella* sp. deve estar ausente em 25 g.

As frutas e vegetais minimamente processados são mais suscetíveis a contaminações devido à ausência da barreira natural da pele. São diversos os desinfetantes utilizados na indústria, mas são pouco eficazes e reduzem apenas 1 a 2 Log numa população de *Salmonella* Chester no caso de maçãs frescas cortadas (Mukhopadhyay e Ramaswamy, 2012).

No caso de *Salmonella* presente em alimentos, mais especificamente em frutas e vegetais, são poucos os casos reportados pela União Europeia. Apenas foram detetadas amostras positivas na Irlanda com 0,9 % em sementes secas, na Itália com 2,1 % em vegetais e a Alemanha com 0,2 % de amostras positivas com *Salmonella* em produtos prontos a comer (ESFA, 2010).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes é uma bactéria que se apresenta em forma de bastonete, Gram positiva, anaeróbio facultativa, possuidora de catalase mas não contém citocromo C (teste da oxidase negativo) (Bubert *et al.*, 1997). É um microrganismo psicrotrófico capaz de crescer a temperaturas de refrigeração e em locais onde as condições atmosféricas são frias e húmidas (Fang *et al.*, 2013). Produz ácido, mas não produz gás a partir de alguns hidratos de carbono (Ferreira e Sousa, 2000). Os animais doentes ou portadores podem estar na origem das estirpes de *Listeria* patogénicas para os seres humanos. A bactéria tolera teores elevados de sal, pH ácido e desidratação. Pode crescer numa variada gama de temperaturas (Penteado e Leitão, 2004). Este microrganismo não representa um perigo para todas as pessoas, apenas para alguns grupos mais frágeis, como é o caso dos recém-nascidos, grávidas, idosos, doentes crónicos e indivíduos com o sistema imunológico enfraquecido. A listeriose neonatal é a mais comum, sendo a bactéria ingerida pela mãe e afetando o feto. Pode ser adquirida através da ingestão de alimentos contaminados, no caso dos alimentos prontos a consumir lácteos e cárneos, bem com algumas frutas e vegetais (Fang *et al.*, 2013). A doença tardia ocorre 2 a 3 semanas após o parto e pode manifestar-se como uma meningite (Ferreira e Sousa, 2000; Churchill, Lee e Hall, 2006). Em Portugal no período de 2004 a 2007 apesar da ocorrência desta patologia ser baixa, 67 casos por milhão de habitantes, de listeriose foram diagnosticados nesse espaço de tempo. A mortalidade foi superior a 40% para os 24 casos em que foi conhecida a evolução clínica da doença (Almeida *et al.*, 2009). Na União Europeia (EU – 27 países) foram identificados e confirmados 1601 casos (EFSA, 2010). A dose de infeção da listeriose não é conhecida pois depende da estirpe e da suscetibilidade do indivíduo.

A Comissão Internacional da Especificação Microbiológica para alimentos (ICMSF) refere que 100 UFC/g de *L. monocytogenes* em alimentos no momento de consumo é aceitável e não se torna um risco (Jofré *et al.*, 2005). Na União Europeia é obrigatório, para alimentos prontos a comer, uma ausência de *L. monocytogenes* em 25 g (Kotzekidou, 2013). Segundo o regulamento (CE) nº 1441/2007, para Alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais, o seu limite pode ser 100 UFC/g, que é aplicado a produtos colocados no mercado durante o seu período de vida útil, ou

deve estar ausente em 25 g, que se aplica antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu.

Cronobacter sakazakii

Enterobacter sakazakii foi classificada como um novo género, *Cronobacter*, após a publicação dos trabalhos realizados por Iversen *et al.* (2007a, 2008). *C. sakazakii* é um microrganismo Gram negativo, móvel, não forma esporos e é anaeróbio facultativo (Lehner *et al.*, 2006). A capacidade de *C. sakazakii* crescer a temperaturas tão baixas como 5,5 °C levanta uma preocupação sobre a sua habilidade de crescer em produtos frescos cortados, aumentando assim o risco de infeções em consumidores com o sistema imunológico mais frágil (Beuchat *et al.*, 2009). É considerado um microrganismo patogénico emergente oportunista associado, principalmente, com infeções em recém-nascidos e crianças (Lenher *et al.*, 2006; Baumgartner *et al.*, 2009; Hyeon *et al.*, 2010). Embora sejam raros os casos de surtos, os recém-nascidos infetados podem desenvolver sintomas graves como meningite, sepsis e enterocolite necrótica com uma taxa de mortalidade de cerca de 40 a 80 %. O leite em pó para bebés e crianças tem sido considerado um veículo responsável por cerca de 50 a 80 % das infeções de *Cronobacter* (Hyeon *et al.*, 2010). Foram registados desde 1958, altura em que ocorreu o primeiro caso, até 2004 cerca de 70 casos de surtos por todo o mundo e cerca de 20 mortes de recém-nascidos e crianças registadas até então. Contudo, a fonte destas mortes na maioria das situações, não foi conhecida. No entanto, num pequeno número de casos foram as fórmulas em pó para bebés e crianças que veicularam a bactéria. As especificações atuais do *Codex Alimentarius* permitem 1 a 10 bactérias coliformes, incluindo *Cronobacter*, por grama de fórmula infantil (Drudy *et al.*, 2006).

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo da qualidade microbiológica de fruta minimamente processada comercializada no Algarve. As frutas selecionadas para o estudo foram a maçã, o abacaxi, a manga, o mamão/papaia, o melão, a meloa *cantaloupe* e a meloa gália. Para concretizar o objetivo geral foram delineados objetivos específicos, nomeadamente:

1. Estudar a qualidade microbiológica de fruta minimamente processada através da contagem de microrganismos aeróbios totais, aeróbios psicrotróficos, bactérias ácido-lácticas, fungos filamentosos e leveduras, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus aureus*.
2. Estudar a qualidade microbiológica de fruta minimamente processada após a data do prazo de validade ter expirado através da contagem de microrganismos aeróbios totais, aeróbios psicrotróficos, bactérias ácido-lácticas, fungos filamentosos e leveduras, *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus aureus*.
3. Detetar a presença de agentes patogénicos de origem alimentar (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Cronobacter sakazakii*) utilizando técnicas de microbiologia clássica.
4. Confirmar as colónias presumíveis pertencentes ao género *Salmonella* e às espécies *Listeria monocytogenes* e *Cronobacter sakazakii* por técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR).

Todo o material utilizado neste estudo foi adquirido através do projeto PTDC/AGR-ALI/111687/2009 “Novas abordagens para o controlo da contaminação por microrganismos patogénicos e aumento da segurança e qualidade da fruta fresca cortada” da Universidade do Algarve.

3. Material e Métodos

3.1. Amostras

O estudo da qualidade microbiológica de fruta minimamente processada antes e depois de ultrapassado o prazo de validade foi realizado em amostras adquiridas em supermercados nas zonas de Faro, Almancil e Albufeira.

O número de amostras de fruta estudado foi de 42, sendo 6 exemplares de cada fruta, perfazendo um total de 7 frutas (maçã, abacaxi, manga, mamão/papaia, melão, meloa *cantaloupe* e a meloa gália). As amostras foram identificadas numericamente, tendo-se registado o local de venda, a validade e o dia de análise (Anexo I, tabela 20). As amostras foram transportadas para o laboratório dentro de um saco térmico e guardadas a 4 °C até à sua análise, no dia em que eram adquiridas e dentro do prazo de validade das mesmas. As figuras 6 e 7 mostram as diferentes frutas analisadas.

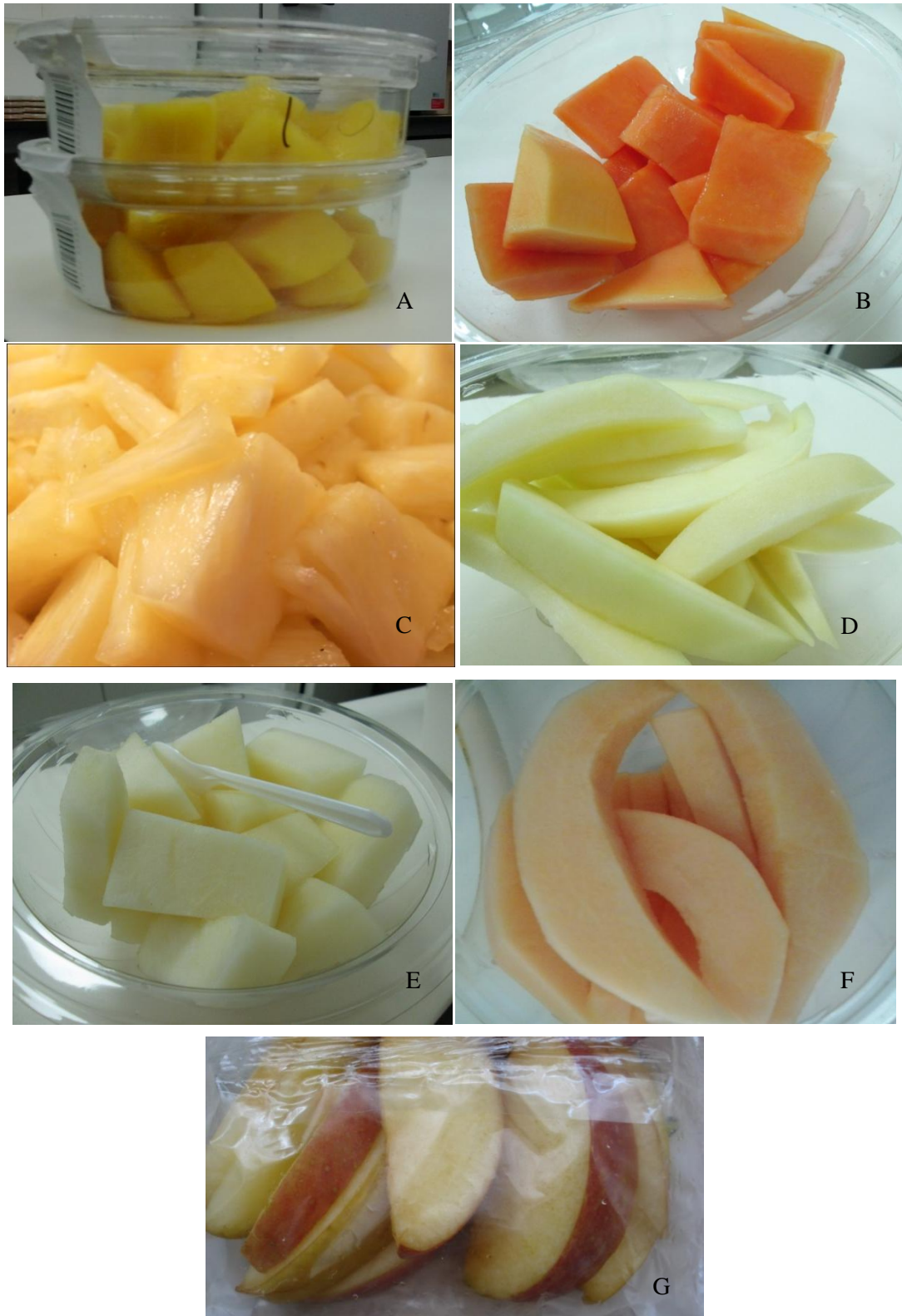


Figura 6 – Fruta minimamente processada utilizada no estudo de avaliação de qualidade microbiológica (A) Manga, (B) Mamão/Papaia, (C) Abacaxi, (D) Meloa gália, (E) Melão, (F) Meloa *cantaloupe*, (G) Maçã

A qualidade microbiológica que a fruta minimamente processada apresentava após a data indicativa do prazo de validade, foi estudada quando as amostras, armazenadas à temperatura de refrigeração, manifestavam características de degradação. As principais são a alteração de cor, da textura, do brilho e presença de líquidos. Em alguns casos, as embalagens encontravam-se opacas devido à ocorrência de processos fermentativos acompanhados de liberação de gás.

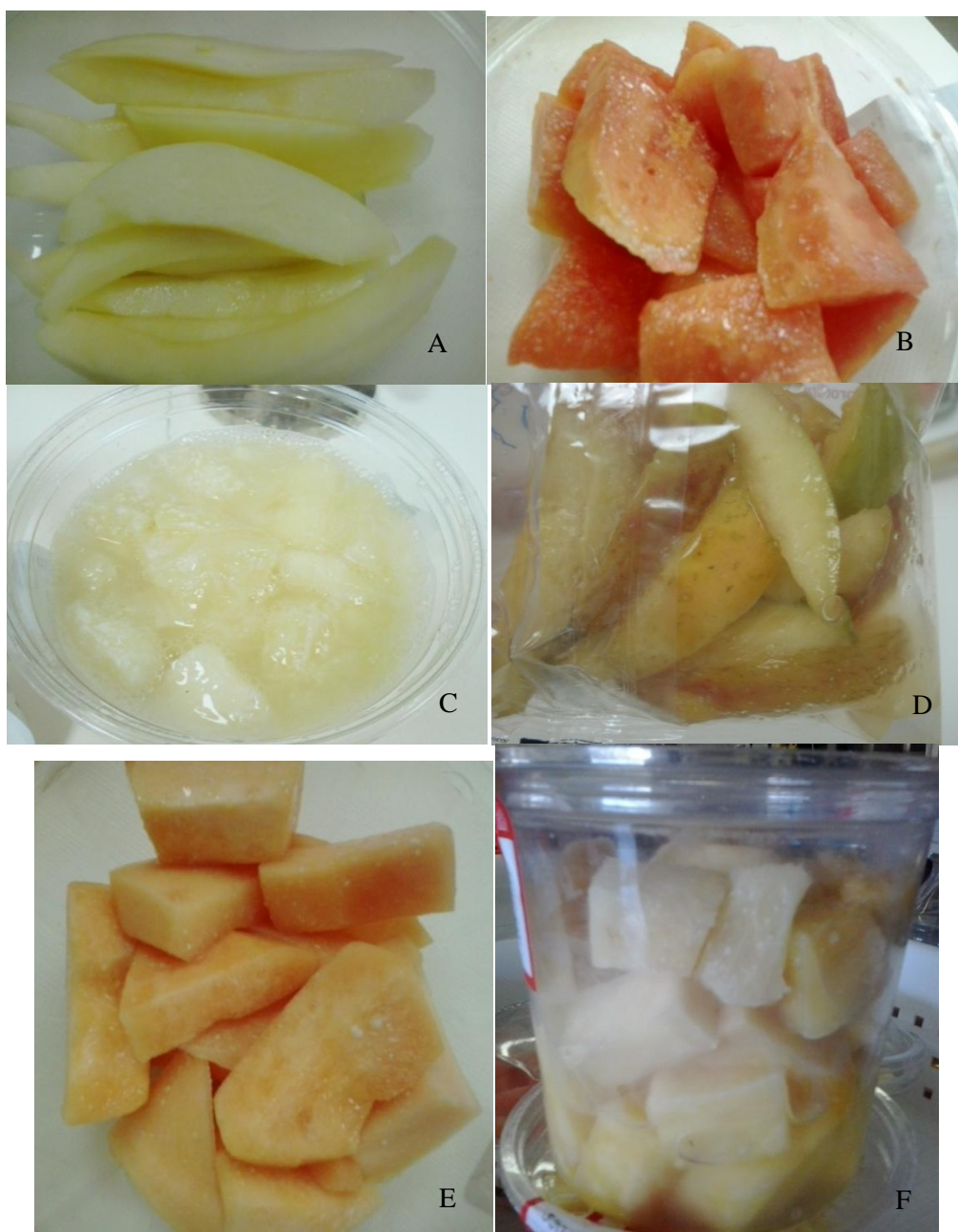


Figura 7 - Fruta minimamente processada fora do prazo de validade utilizada no estudo de avaliação de qualidade microbiológica (A) Melão gália, (B) Mamão/Papaia, (C) Melão, (D) Maçã, (E) Melão cantaloupe, (F) Abacaxi

3.2. Metodologias de análise

Parâmetros microbiológicos

Preparação das amostras

Para realizar as análises microbiológicas às amostras de fruta cortada, misturaram-se 25 g de massa da amostra com 225 ml de solução de Água Peptonada Tamponada (APT – *Oxoid*) pH $7,2 \pm 0,2$ a 25 °C. Esta mistura foi posteriormente homogeneizada, durante 1 minuto em sacos de polietileno estéreis, num homogeneizador (Blender, *Stomacher* 400). Após a homogeneização, efetuou-se uma série de diluições sucessivas com solução de APT. Posteriormente, procedeu-se à inoculação nos meios de cultura adequados.

Contagem da microbiota a 30 °C – *Mesófilos*

A contagem de microrganismos aeróbios mesófilos realizou-se de acordo com a norma ISO 4833:2003 (E). Procedeu-se à inoculação por incorporação de 1 ml de cada uma das diluições, em duplicado, utilizando o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA-*Scharlau*), pH $7 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas foram incubadas a 30 °C, durante 72 horas.

Contagem da microbiota a 6,5 °C – *Psicrotróficos*

A contagem de microrganismos aeróbios psicrotróficos efetuou-se de acordo com a norma ISO 17410:2001 (E). Procedeu-se à inoculação por espalhamento de 0,1 ml de cada uma das diluições, em duplicado, na superfície do meio de cultura PCA, pH $7 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas foram incubadas a 6,5 °C durante 10 dias.

Contagem de Bactérias Lácticas (BAL)

A contagem de BAL efetuou-se de acordo com a norma BS ISO 15214:1998, tendo-se inoculado por incorporação 1 ml de cada uma das diluições, em duplicado, no meio de cultura *de Man Rogosa e Sharpe* (MRS – *Biokar*), pH $6,2 \pm 0,2$ a 25 °C. Posteriormente, adicionou-se uma segunda camada do mesmo meio. As placas foram incubadas a 30 °C, durante 72 horas.

Contagem de bolores e leveduras

A contagem de bolores e leveduras realizou-se de acordo com a norma ISO 21527-1:2008 (E). Procedeu-se à inoculação por espalhamento de 0,2 ml de cada uma das diluições, em duplicado, na superfície do meio de cultura *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar* (DRBC agar – Scharlau), pH $5,6 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas foram incubadas a 25 °C, durante 5 dias.

Contagem de coliformes

A contagem de coliformes e de *Escherichia coli* efetuou-se de acordo com González *et al.*, 2003. Procedeu-se à inoculação por incorporação de 1 ml de cada uma das diluições, em duplicado, do meio de cultura *Chromocult coliform Agar* (Chromocult - Merck), pH $6,8 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 horas.

Contagem de *Staphylococcus aureus*

A contagem de *Staphylococcus aureus* realizou-se de acordo com a norma ISO 6888-1:1999 (E). Procedeu-se à inoculação por espalhamento de 0,1 ml de cada uma das diluições, em duplicado, na superfície do meio de cultura *Baird Parker Agar* (BP-Biokar), pH $7,2 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 48 horas.

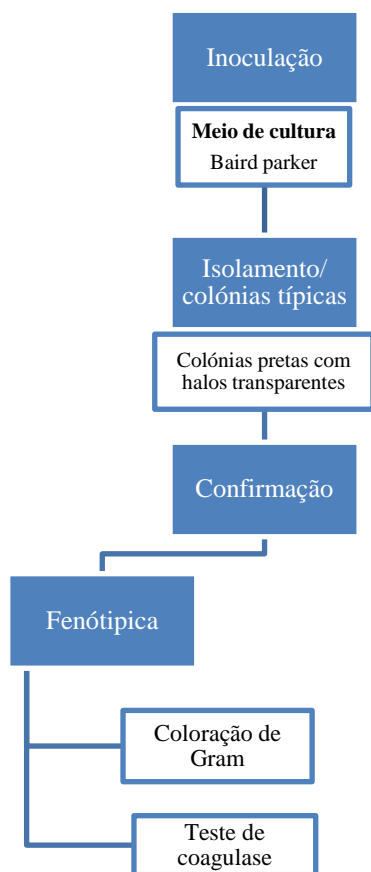


Figura 8 – Contagem e confirmação de *Staphylococcus aureus*

Pesquisa de *Salmonella* sp.

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada de acordo com o descrito na norma UNE-EN ISO 6579:2002. Retirou-se do meio de pré-enriquecimento, previamente preparado, 0,1 mL para tubos que continham 10 mL do meio de cultura de enriquecimento *Rapaport-Vassiliadis* (RV – *Oxoid*), pH $5,2 \pm 0,2$ a 25 °C e 1 mL para tubos com 10 mL do meio de cultura *Muller Kauffmann Tetrathionate – Novobiocin broth* (MKTTn – *Oxoid*), pH $8 \pm 0,2$ a 25 °C. Estas culturas foram incubadas a 37 °C, durante 24 horas. Após o período de incubação, dos tubos em que ocorreu uma reação positiva, procedeu-se à inoculação de uma ansada para a superfície do meio de cultura *Brilliance Salmonella Agar base* (*Brilliance – Oxoid*), pH $7,3 \pm 0,1$ a 25 °C e *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* (XLD – *Scharlau microbiology*), pH $7,4 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, pesquisou-se a presença de colónias típicas que no caso do meio de cultura *Brilliance* são roxas e no caso de XLD são vermelhas.

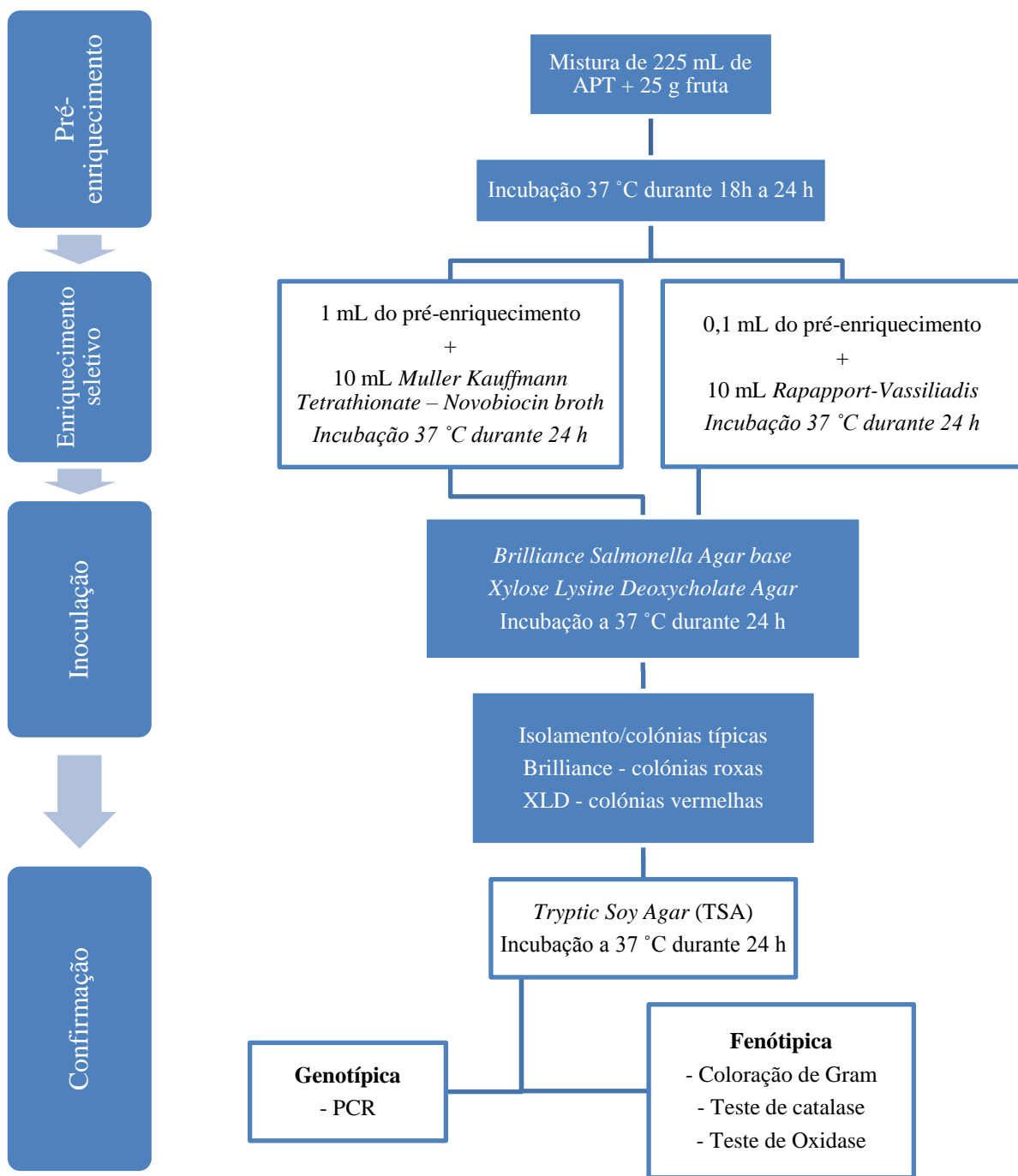


Figura 9 - Pesquisa de *Salmonella* sp., isolamento, identificação e métodos de confirmação (UNE-EN ISO 6579:2002)

Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* realizou-se de acordo com a norma ISO 11290-1:1996. Misturaram-se 25 g de massa da amostra com 225 ml de solução de *Half Fraser* (*Biokar diagnostics*) pH $7,2 \pm 0,2$ a 25 °C. Esta mistura de pré-enriquecimento foi posteriormente homogeneizada durante 1 minuto em sacos de polietileno estéreis adequados num homogeneizador (Blender, Stomacher 400). Os frascos com *Half Fraser* e a massa da amostra (pré-enriquecimento) foram incubados à temperatura de 30 °C durante 24 h. Retirou-se do meio de pré-enriquecimento 0,1 mL para tubos que continham 10 mL de *Fraser broth* (*Fraser – Biokar diagnostics*), pH $7,2 \pm 0,2$ a 25 °C, designado por meio de enriquecimento. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 48 horas. Do mesmo meio de pré-enriquecimento foi inoculada uma ansada para o meio de cultura *Palcam Agar* (*Palcam – Biokar diagnostics*), pH $7,2 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, dos tubos que em que ocorreu uma reação positiva procedeu-se à inoculação de uma ansada para a superfície do meio de cultura *Palcam*. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação pesquisou-se a presença de colónias típicas que no caso de *L. monocytogenes* são verdes escuras com halos escuros.

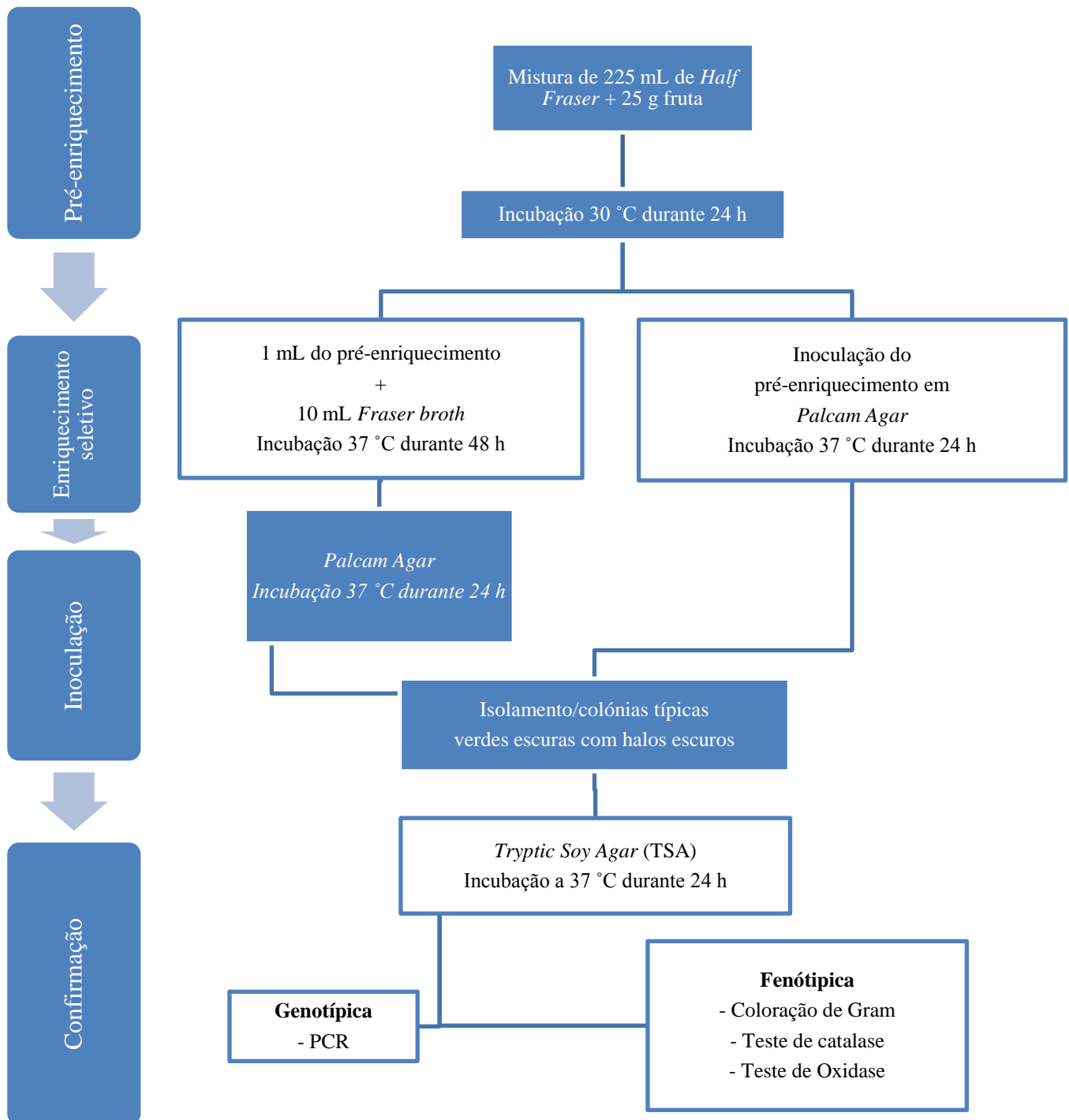


Figura 10 – Pesquisa de *Listeria monocytogenes*, isolamento, identificação e métodos de confirmação (ISO 11290-1:1996)

Pesquisa de *Cronobacter sakazakii*

Para realizar a pesquisa de microrganismos patogênicos nas amostras de fruta cortada, misturaram-se 25 g de massa da amostra com 225 ml de solução de APT, pH $7,2 \pm 0,2$ a 25 °C. Esta mistura designada de pré-enriquecimento, foi posteriormente homogeneizada, durante 1 minuto em sacos de polietileno estéreis num homogeneizador (Blender, Stomacher 400). As misturas de pré-enriquecimento em APT foram incubadas à temperatura de 37 °C, durante 24 h.

A pesquisa de *Cronobacter sakazakii* foi realizada de acordo com o descrito em Chap *et al.*, 2009. Procedeu-se à transferência de 10 mL do meio de pré-enriquecimento para frascos contendo 90 mL de meio de enriquecimento para enterobactérias (EEbroth – *Scharlau microbiology*), pH $7,2 \pm 0,2$ a 25 °C. Estas misturas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, procedeu-se à inoculação de uma ansada para a superfície do meio de cultura *Chromogenic Enterobacter Sakazakii agar* (DFI *Duncan, Forsythe e Iversen* – Oxoid), pH $7,3 \pm 0,2$ a 25 °C. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 18 horas. Após o período de incubação pesquisou-se a presença de colônias típicas que no caso do *C. sakazakii* apresentam-se como colônias pequenas de cor azul.

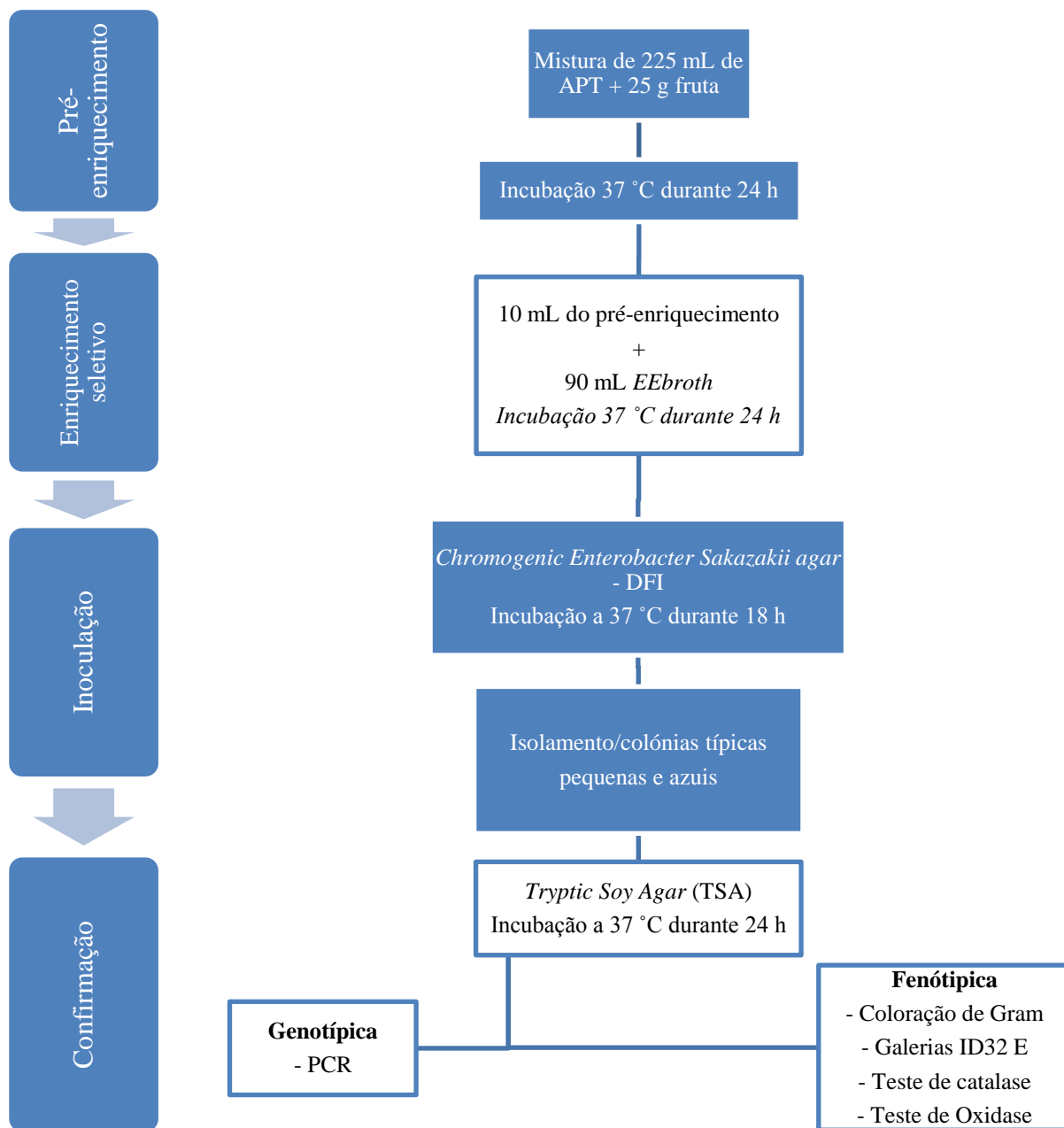


Figura 11 – Pesquisa de *Cronobacter sakazakii*, isolamento, identificação e métodos de confirmação (Chap *et al.*, 2009)

3.3. Isolamento de bactérias

Após a detecção das colónias típicas de bactérias de cada género/espécie nos diferentes meios de cultura, selecionaram-se as colónias isoladas e repicaram-se para placas com *Tryptic Soy agar* (TSA - Scharlau). Sempre que necessário repicou-se novamente para assegurar a pureza das culturas. Decorridas 24 horas de incubação a 37 °C, realizaram-se os testes de catalase, oxidase e colorações de Gram.

3.4. Manutenção das culturas de bactérias

As culturas de bactérias foram colocadas a crescer em 5 mL de meio de cultura líquido Nutrient Broth a 37 °C numa incubadora orbital a 150 rpm (IKA KS 4000i). Cerca de 18 a 20 horas depois, as culturas (0,5 mL) foram colocadas em criotubos contendo 0,5 mL de glicerol (100 %) e congeladas a -80 °C.

3.5. Identificação molecular das bactérias patogénicas

A confirmação molecular da identidade dos isolados de bactérias patogénicas (presuntivas) do género *Salmonella* e das espécies *Listeria monocytogenes* e *Cronobacter sakazakii* realizou-se por reação em cadeia de polimerase (PCR). Este estudo teve início com a extração do DNA dos microrganismos.

Extração de DNA total de bactérias Gram negativas (*Salmonella* sp. e *C. sakazakii*)

A extração de DNA total de bactérias Gram negativas (*Salmonella* sp. e *C. sakazakii*) foi realizada segundo o descrito em Jofré *et al.*, 2005, Lehner *et al.*, 2004, Lenher *et al.*, 2006 e Iversen *et al.*, 2007. As bactérias foram crescidas em meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI – Scharlau) a 37 °C durante 24 h com agitação numa incubadora orbital (IKA KS 4000i). As culturas (2 mL) foram centrifugadas a 12000 rpm a 4 °C durante 5 minutos numa centrífuga (Eppendorf 5415 R). Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 5 µL de água destilada Milli-Q estéril. Procedeu-se à incubação das células durante 10 minutos a 100 °C até se observar a lise celular. Adicionou-se 450 µL de uma solução de 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA e ainda 13 µL de uma solução SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10 %. Procedeu-se a uma agitação em vortéx com duração de 1 minuto e incubação durante 5 minutos a 65 °C. Adicionaram-se 200 µL de solução de acetato de potássio 5 M e colocou-se em gelo durante 10 minutos. Centrifugou-se durante 15 minutos a 14000 rpm a 4 °C. Retirou-se

o sobrenadante para um novo microtubo contendo 600 µL de isopropanol (-20 °C) e incubou-se novamente à temperatura ambiente (cerca de 20 °C) durante 10 minutos. Após uma nova centrifugação durante 15 minutos a 4 °C a 12000 rpm, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com etanol a 70 %. Efetuou-se uma nova centrifugação durante 3 minutos a 4 °C a 12000 rpm e retirou-se cuidadosamente o etanol e o seu excesso com um papel absorvente. Deixou-se evaporar o etanol a 37 °C. Ressuspendeu-se o DNA em 25 µL de água destilada ultra pura estéril. Procedeu-se à quantificação do DNA por fotometria (*Nanodrop*) e armazenou-se a -20 °C.

Extração de DNA total de bactérias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*)

A extração de DNA total de bactérias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*) foi realizada segundo o método descrito em Bubert *et al.*, 1992 e Bubert *et al.*, 1997. As bactérias foram crescidas em meio de cultura líquido *Brain Heart Infusion* (BHI – *Scharlau*) a 30 °C durante 24 h com agitação numa incubadora orbital (IKA KS 4000i). As culturas (1,8 mL) foram centrifugadas a 5000 rpm a 4 °C durante 10 minutos numa centrífuga (*Eppendorf* 5415 R). Procedeu-se à lavagem do *pellet* com água destilada Milli-Q estéril. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 100 µL de tampão de lise (T.E.) e 25 µL de lisozima (10 mg/mL). Procedeu-se à incubação das células durante 45 minutos a 1 hora a 37 °C. Adicionou-se 500 µL de uma solução de GES e agitou-se no vortéx. Posteriormente os tubos foram colocados em gelo durante 5 minutos. Adicionaram-se 250 µL de solução de acetato de amónia 10 M, homogeneizou-se e colocou-se em gelo durante 10 minutos. Adicionaram-se 500 µL de Clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e misturou-se por inversão. Centrifugou-se 10 minutos a 13000 rpm a 4 °C. Retirou-se o sobrenadante para um novo microtubo contendo ½ do volume de isopropanol e homogeneizou-se por inversão durante cerca de 1 minuto. Após uma nova centrifugação durante 5 minutos a 4 °C a 13000 rpm, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com etanol a 70 % frio. Efetuou-se uma nova centrifugação durante 5 minutos a 4 °C a 13000 rpm, repetindo este processo por mais 2 vezes e retirou-se cuidadosamente o etanol e o seu excesso com um papel absorvente. Deixou-se evaporar o etanol a 37 °C. Ressuspendeu-se o *pellet* em 25 µL de água destilada ultra pura estéril e deixou-se em gelo durante aproximadamente 1 hora. Procedeu-se à quantificação do DNA por fotometria (*Nanodrop*). Após esse processo armazenou-se a -20 °C.

3.6. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Salmonella sp.

A identificação presuntiva dos isolados pertencentes ao género *Salmonella* foi avaliada através da amplificação do gene *invA*, localizado na ilha de patogenicidade 1 que codificam as proteínas do sistema de secreção de tipo III, descritas como essenciais para a invasão das células epiteliais por *Salmonella*, de acordo com Jofré *et al.*, 2005. Os primers utilizados foram o 139 (5' – gtgaaattatcgccacgttcgggcaa-3') e o 141 (5'-tcatcgcaccgtcaaaggaacc-3'). As reações de PCR foram realizadas num volume total de 60 µL contendo 50 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 50 µM de cada primer, 0,43 µL de Taq polimerase (Promega) e 2,57 µL de solução de DNA (50 – 500 ng). As condições em que decorreram as reações de PCR encontram-se resumidas na tabela 3.

Tabela 3 - Condições de amplificação para identificação de bactérias do género *Salmonella*

Bactéria	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Género <i>Salmonella</i>	Desnaturação inicial	95	1 minuto
	Desnaturação	95	30 s
	Annealing	64	30 s
	Extensão	72	30 s
	Extensão final	72	4 minutos

A amplificação decorreu num termociclador (Thermo Electron's Px2 Thermal Cycler) e teve início com um passo de desnaturação inicial a 95 °C durante 1 minuto, seguidos de 38 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, “annealing” a 64 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 30 segundos. No final ocorreu um passo de extensão a 72 °C durante 4 minutos.

Os produtos de amplificação gerados têm 284 bp e foram analisados por eletroforese e gel de agarose (1 %) em tampão TAE, corados com brometo de etídio.

Listeria monocytogenes

A identificação presuntiva dos isolados pertencentes ao género *Listeria* foi avaliada através da amplificação do gene *iap*, de acordo com Bubert *et al.*, 1992 e Bubert *et al.*, 1997. Os *primers* utilizados foram UnilisA (5'-gctacagctgggattgcggt-3') e LisB (5'-ttatacgcgaccgaagccaa-3'). As reações de PCR foram realizadas num volume total de 70 µL contendo 50 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 50 µM de cada primer, 0,5 µL de Taq polimerase (Promega) e 3 µL de solução de DNA (50 – 500 ng). As condições em que decorreram as reações de PCR encontram-se resumidas na tabela 4.

Tabela 4 - Condições de amplificação para identificação de bactérias do género *Listeria* e espécie *Listeria monocytogenes*

Bactéria	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Género <i>Listeria</i> e espécie <i>L. monocytogenes</i>	Desnaturação inicial	94	3 minutos
	Desnaturação	94	1 minuto
	Annealing	56	45 s
	Extensão	72	45 s
	Extensão final	72	5 minutos

A amplificação decorreu num termociclador (Thermo Electron's Px2 Thermal Cycler). O passo de desnaturação inicial ocorreu a 94 °C, durante 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C, durante 1 minuto, "annealing" a 56 °C durante 45 segundos e extensão a 72 °C, durante 45 segundos. Para finalizar o programa ocorreu um passo de extensão a 72 °C, durante 5 minutos.

Os produtos de amplificação gerados têm 1400 bp e foram analisados por eletroforese e gel de agarose (1 %) em tampão TAE, corados com brometo de etídio.

Os isolados pertencentes ao género *Listeria* foram testados para a espécie *L. monocytogenes*. Esta identificação foi realizada utilizando *primers* específicos, MonoA (5'-caaactgctaacacagctact-3') e MonoB (5'-gcacttgaattgctgttattg-3'). As reações de PCR foram realizadas num volume total de 70 µL contendo 50 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 50 µM de cada primer, 0,5 µL de Taq polimerase (Promega) e 3 µL de solução de DNA (50 – 500 ng). As condições em que decorreram as reações de PCR encontram-se resumidas na tabela 4.

Os produtos de amplificação gerados têm aproximadamente 400 bp e foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1 %) em tampão TAE, corados com brometo de etídio.

Cronobacter sakazakii

A identificação presuntiva dos isolados pertencentes ao género *Cronobacter* foi avaliada através da amplificação do gene que contém a informação da α -glucosidase (gene *gluA*), de acordo com Lehner *et al.*, 2006. Os *primers* utilizados foram EsAgf (5'-tgaaagcaatcgacaagaag-3') e EsAgr (5'-actcattaccctctgatg-3'). As reacções de PCR foram realizadas num volume total de 70 μ L contendo 50 mM de $MgCl_2$, 2,5 mM de dNTPs, 50 μ M de cada primer, 0,5 μ L de Taq polimerase (Promega) e 3 μ L de solução de DNA (50 – 500 ng). As condições em que decorreram as reacções de PCR encontram-se resumidas na tabela 5.

Tabela 5 – Condições de amplificação para identificação de bactérias do género *Cronobacter*

Bactéria	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Género <i>Cronobacter</i>	Desnaturação inicial	94	2 minutos
	Desnaturação	94	30 s
	Annealing	62,5	30 s
	Extensão	72	30 s
	Extensão final	72	5 minutos

A amplificação decorreu num termociclador (Thermo Electron's Px2 Thermal Cycler), com um passo de desnaturação inicial a 94 °C, durante 2 minutos, seguidos de 29 ciclos de desnaturação a 94 °C, durante 30 segundos, "annealing" a 62,5 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C, durante 30 segundos. No final ocorreu um passo de extensão a 72 °C, durante 5 minutos.

Os produtos de amplificação gerados têm 1680 bp e foram analisados por eletroforese e gel de agarose (1 %) em tampão TAE, corados com brometo de etídio.

Os isolados pertencentes ao género *Cronobacter* foram testados para a espécie *C. sakazakii*. Esta identificação foi realizada utilizando *primers* específicos delineados com base na sequência do gene que contém a informação genética para a subunidade β da RNA polimerase (gene *rpoB*), de acordo com Stoop *et al.*, 2009. Os *primers* utilizados foram Esakf (5'-gctytgctgacgagtggcgg-3') e Esakr (5'-atctctgcaggattctctgg-3'). As reacções de PCR foram realizadas num volume total de 70 μ L contendo 50 mM de $MgCl_2$, 2,5 mM de dNTPs, 50 μ M de cada primer, 0,5 μ L de Taq polimerase (Promega) e 3 μ L de solução de DNA (50 – 500 ng). As condições em que decorreram as reacções de PCR encontram-se resumidas na tabela 6.

Tabela 6 - Condições de amplificação para identificação de bactérias da espécie *Cronobacter sakazakii*

Bactéria	Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Espécie <i>C. sakazakii</i>	Desnaturação inicial	94	3 minutos
	Desnaturação	94	1 minuto
	Annealing	67,5	30 s
	Extensão	72	1 minuto
	Extensão final	72	5 minutos

Para a espécie *C. sakazakii* o passo de desnaturação inicial ocorreu a 94 °C, durante 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C, durante 1 minuto, “annealing” a 67,5 °C durante 30 segundos e extensão a 72 °C, durante 1 minuto. Para finalizar o programa ocorreu um passo de extensão a 72 °C, durante 5 minutos.

Os produtos de amplificação gerados têm 514 bp e foram analisados por eletroforese e gel de agarose (1 %) em tampão TAE, corados com brometo de etídio.

Os reagentes utilizados na mistura para PCR, volumes e concentrações encontram-se resumidas na tabela 7.

Tabela 7 - Reagentes utilizados na mistura para PCR (Mix) para as 3 bactérias

Reagentes	Volume (µl)		Concentração
Água ultra pura estéril (milli-Q)	35,7	30,6	-
Tampão Taq polimerase	14	12	1x
MgCl ₂ (50 mM)	7	6	2,5 mM
dNTPs (2,5 mM)	7	6	250 µM
Primer Forward (50 µM)			
Género:			
(<i>Cronobacter</i>)	Espécie:		
EsAf	(<i>C. sakazakii</i>)	1,4	1,2
(<i>Salmonella</i>)	Csak f		1 µM
139	(<i>L. monocytogenes</i>)		
(<i>Listeria</i>)	MonoA		
UnilisA			
Primer Reverse (50 µM)			
Género:			
(<i>Cronobacter</i>)	Espécie:		
EsAgr	(<i>C. sakazakii</i>)	1,4	1,2
(<i>Salmonella</i>)	Csak r		1 µM
141	(<i>L. monocytogenes</i>)		
(<i>Listeria</i>)	MonoB		
lisB			
Taq polimerase	0,5	0,43	5 unidades
DNA (50 – 500 ng)	3	2,57	-
Total	70	60	-

Os tamanhos dos fragmentos de DNA obtidos foram estimados por comparação com um marcador de DNA (100 bp Ladder V, Biorad) para a *Salmonella* e um marcador de

DNA (200 bp Ladder I, Biorad) para as espécies *L. monocytogenes* e *C. sakazakii*. Após a eletroforese (55 V; 50 A; 90 min), os géis foram visualizados no sistema G-Box Syngene- Genesys 10 UV Scanner.

Parâmetros físico-químicos

Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada utilizando um potenciômetro (Crison Micro pH 2000) equipado com um eletrodo de pH para alimentos sólidos. O aparelho foi calibrado utilizando duas soluções padrão (pH 7 e pH 4). Posteriormente, foram realizadas 3 leituras de pH em cada amostra de fruta.

Análise estatística de resultados

A preparação dos dados e a elaboração de gráficos foram realizadas recorrendo ao programa informático da Microsoft Office Excel 2007 em ambiente Windows 7.

Foi efetuada uma análise de variância (ANOVA) aos resultados obtidos utilizando o programa IBM SPSS *Statistics* versão 19, para testar as diferenças entre a qualidade da fruta minimamente processada estudada antes do prazo de validade ser ultrapassado e após o término do mesmo. Utilizando a estatística de teste *t* para amostras independentes, considerou-se um nível de significância de 5 %.

4. Resultados

4.1. Qualidade microbiológica de fruta minimamente processada

Os resultados da qualidade microbiológica da fruta fresca minimamente processada comercializada no Algarve, estudada no âmbito deste trabalho, encontram-se resumidos nas Tabelas 8, 9, 10, 11 e 12.

As contagens de microrganismos aeróbios mesófilos variaram entre 3,8 e 9,9 Log UFC/g (Tabela 8). Cerca de 38,5 % das amostras estudadas continha valores inferiores a 10^5 UFC/g. A fruta que apresentou um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foi o abacaxi e a que apresentou o nível médio mais elevado foi a maçã (8,1 Log UFC/g), seguida da manga (6,3 Log UFC/g).

Tabela 8 – Microrganismos aeróbios mesófilos em fruta minimamente processada

	Percentagem de amostras em intervalos						Intervalo ^b	Média ^b
	n	<10 ⁵ ^a	10 ⁵ – 10 ⁶	10 ⁶ – 10 ⁷	10 ⁷ – 10 ⁸	≥ 10 ⁸		
Fruta fresca cortada	39	38,5	25,6	10,3	12,8	12,8	3,8-9,9	5,8
Maçã	6	0	0	16,7	50	33,3	6,3-9,9	8,1
Abacaxi	4	75	25	0	0	0	3,8-5,4	4,3
Manga	6	50	0	16,7	0	33,3	4,0-9,2	6,3
Mamão/Papaia	5	80	0	0	20	0	4,4-7,4	5,2
Melão	6	33,3	33,3	0	16,7	16,7	4,33-8,9	6,1
Meloa cantaloupe	6	16,7	66,6	16,7	0	0	4,5-6,6	5,5
Meloa gália	6	33,3	50	16,7	0	0	4,6-6,3	5,2

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de fruta

No que diz respeito aos microrganismos aeróbios psicotróficos, observou-se que as contagens variaram entre 3,3 e 10,7 Log UFC/g (Tabela 9). Cerca de 33 % das amostras estudadas continha valores inferiores a 10^5 UFC/g. O valor médio de microrganismos psicotróficos (5,9 Log UFC/g) na fruta fresca cortada foi semelhante ao dos microrganismos aeróbios mesófilos (5,8 Log UFC/g). As frutas que apresentaram um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota, foram a manga e o mamão/papaia (5,3 Log UFC/g) e a que apresentou o nível médio mais elevado foi a maçã (7,7 Log UFC/g), seguida da meloa *cantaloupe* (6,2 Log UFC/g).

Tabela 9 – Microrganismos aeróbios psicrotróficos em fruta minimamente processada

Porcentagem de amostras em intervalos								
	<i>n</i>	$< 10^5$ ^a	$10^5 - 10^6$	$10^6 - 10^7$	$10^7 - 10^8$	$\geq 10^8$	Intervalo ^b	Média ^b
Fruta fresca cortada	42	33,3	28,6	11,9	16,7	9,5	3,3-10,7	5,9
Maçã	6	0	0	33,3	50	16,7	6,5-10	7,7
Abacaxi	6	33,3	33,3	16,7	16,7	0	4,1-6,1	5,5
Manga	6	50	33,3	0	16,7	0	4,5-7,0	5,3
Mamão/Papaia	6	50	16,7	0	33,3	0	3,7-8,0	5,3
Melão	6	33,3	50	16,7	0	0	4,4-7,0	5,4
Meloa cantaloupe	6	16,7	50	0	16,7	16,7	3,3-10,6	6,2
Meloa gália	6	50	16,7	16,7	0	16,7	4,3-10,7	6,0

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de produto

Relativamente às bactérias ácido-lácticas (BAL) na fruta minimamente processada estudada neste trabalho, observou-se que as contagens variaram entre 3,1 e 9,0 Log UFC/g (Tabela 10). Cerca de 58,5 % das amostras estudadas continha valores inferiores a 10^5 UFC/g. A fruta que apresentou um nível médio mais baixo de BAL foi o abacaxi (3,7 Log UFC/g) seguida da meloa gália (3,9 Log UFC/g) e a que apresentou o nível médio mais elevado foi a maçã (6,4 Log UFC/g), seguida do mamão/papaia (5,7 Log UFC/g).

Tabela 10 – Bactérias ácido lácticas em fruta minimamente processada

Porcentagem de amostras em intervalos								
	<i>n</i>	$< 10^5$ ^a	$10^5 - 10^6$	$10^6 - 10^7$	$10^7 - 10^8$	$\geq 10^8$	Intervalo ^b	Média ^b
Fruta fresca cortada	41	58,5	22	9,8	4,9	4,9	3,1-9,0	4,9
Maçã	6	0	50	33,3	0	16,7	5,8-8,1	6,4
Abacaxi	6	83,3	16,7	0	0	0	3,1-5,9	3,7
Manga	6	83,3	0	0	0	16,7	3,9-9,0	4,9
Mamão/Papaia	6	33,3	33,3	16,7	16,7	0	4,2-7,7	5,7
Melão	5	60	0	16,7	16,7	0	3,4-7,6	5,1
Meloa cantaloupe	6	66,7	33,3	0	0	0	3,4-5,8	4,3
Meloa gália	6	83,3	16,7	0	0	0	2,9-5,7	3,9

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de produto

As contagens dos fungos (bolores e leveduras), variaram entre 2,7 e 10,4 Log UFC/g (tabela 11). Cerca de 69 % das amostras estudadas continha valores inferiores a 10^5 UFC/g. Na contagem de colónias apenas foram observadas leveduras, não existindo

nenhum registo de bolores. O valor médio de leveduras presentes na fruta fresca cortada, estudada neste trabalho, (4,9 Log UFC/g) foi semelhante ao valor das BAL (4,8 Log UFC/g). A fruta que apresentou um nível médio mais baixo, deste tipo de microbiota, foi o melão (3,8 Log UFC/g) e a que apresentou o nível médio mais elevado foi a maçã (5,9 Log UFC/g), seguida do abacaxi e do mamão/papaia (4,9 Log UFC/g).

Tabela 11 – Fungos em fruta minimamente processada

Percentagem de amostras em intervalos								
	<i>n</i>	< 10 ⁵ ^a	10 ⁵ – 10 ⁶	10 ⁶ – 10 ⁷	10 ⁷ – 10 ⁸	≥ 10 ⁸	Intervalo ^b	Média ^b
Fruta fresca cortada	42	69	9,5	9,5	4,8	7,1	2,7-10,4	4,8
Maçã	6	16,7	33,3	50	0	0	4,8-6,6	5,9
Abacaxi	6	50	33,3	16,7	0	0	4,2-6,0	4,9
Manga	6	83,3	0	0	0	16,7	3,5-8,1	4,7
Mamão/Papaia	6	66,7	0	0	33,3	0	2,7-7,5	4,9
Melão	6	100	0	0	0	0	3,3-4,6	3,8
Meloa cantaloupe	6	83,3	0	0	0	16,7	2,7-10,4	4,8
Meloa gália	6	83,3	0	0	0	16,7	3,1-10,0	4,7

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de produto

As contagens de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, mais precisamente coliformes, variaram entre 0,0 e 9,1 Log UFC/g (Tabela 12) e cerca de 54,8 % das amostras estudadas continha valores inferiores a 10⁵ UFC/g. O valor médio de coliformes (4,9 Log UFC/g) na fruta fresca cortada, analisada neste estudo, foi igual ao das BAL (4,9 Log UFC/g). A fruta que apresentou um valor médio mais baixo deste tipo de microbiota, foi o abacaxi (2,7 Log UFC/g) e a que apresentou o nível médio mais elevado foi a maçã (6,7 Log UFC/g), seguida da manga (5,3 Log UFC/g). Uma das amostras de abacaxi estudadas não continha bactérias coliformes.

Tabela 12 – Coliformes em fruta minimamente processada

	Percentagem de amostras em intervalos						Intervalo ^b	Média ^b
	<i>n</i>	< 10 ⁵ ^a	10 ⁵ – 10 ⁶	10 ⁶ – 10 ⁷	10 ⁷ – 10 ⁸	≥ 10 ⁸		
Fruta fresca cortada	42	54,8	16,7	16,7	2,4	9,5	0,0-9,1	4,9
Maçã	6	0	16,7	66,6	0	16,7	5,1-8,4	6,7
Abacaxi	6	83,3	0	0	0	16,7	0,0-9,1	2,7
Manga	6	66,6	0	0	0	33,3	2,9-8,4	5,3
Mamão/Papaia	6	66,6	0	16,7	16,7	0	3,4-7,7	5,0
Melão	6	66,6	16,7	16,7	0	0	3,5-6,6	4,7
Meloa cantaloupe	6	33,3	50	16,7	0	0	3,4-6,0	5,0
Meloa gália	6	66,7	33,3	0	0	0	4,5-5,5	4,9

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de produto

4.2. Qualidade microbiológica de fruta minimamente processada determinada após o prazo de validade

Os resultados da qualidade microbiológica da fruta fresca minimamente processada comercializada no Algarve determinados após o fim do prazo de validade, quando a fruta apresentava sinais de degradação, encontram-se resumidos nas Tabelas 13, 14, 15, 16 e 17.

As contagens de microrganismos aeróbios mesófilos variaram entre 3,9 e 11,4 Log UFC/g (Tabela 13). Cerca de 35,9 % das amostras estudadas apresentou valores deste grupo microbiano entre 10⁷ e 10⁸ UFC/g. A fruta que apresentou um nível médio mais baixo, deste tipo de microbiota, foi o abacaxi (5,9 Log UFC/g) e a que apresentou o nível médio mais elevado foi a maçã (8,1 Log UFC/g), seguida da meloa gália e do mamão/papaia (7,7 Log UFC/g).

Tabela 13 – Microrganismos aeróbios mesófilos em fruta minimamente processada contados após o prazo de validade ter sido ultrapassado

Porcentagem de amostras em intervalos								
	<i>n</i>	< 10 ⁵ ^a	10 ⁵ – 10 ⁶	10 ⁶ – 10 ⁷	10 ⁷ – 10 ⁸	≥ 10 ⁸	Intervalo ^b	Média ^b
Fruta fresca cortada	39	5,1	15,4	20,5	35,9	23,1	3,9-11,4	7,4
Maçã	6	0	0	0	83,3	16,7	7,2-11,3	8,1
Abacaxi	6	16,7	50	16,7	0	16,7	3,9-8,4	5,9
Manga	5	20	20	20	0	40	4,7-11,4	7,5
Mamão/Papaia	5	0	20	20	20	40	5,8-10,1	7,7
Melão	5	0	20	20	40	20	5,8-9,5	7,4
Meloa cantaloupe	6	0	0	33,3	50	16,7	6,4-9,7	7,5
Meloa gália	6	0	0	33,3	50	16,7	6,6-10,6	7,7

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de produto

Em relação aos microrganismos aeróbios psicrotróficos, observou-se que as suas contagens variaram entre 5,9 e 11,3 Log UFC/g (Tabela 14). Cerca de 73,8 % das amostras estudadas continha valores superiores ou iguais a 10⁸ UFC/g. A fruta que apresentou um nível médio mais baixo de psicrotróficos foi o abacaxi (7,4 Log UFC/g) e as que apresentaram o nível médio mais elevado foram a meloa *cantaloupe* e a meloa gália (9,3 Log UFC/g), seguida da manga (8,6 Log UFC/g).

Tabela 14 – Microrganismos aeróbios psicrotróficos em fruta minimamente processada contados após o prazo de validade ter sido ultrapassado

Porcentagem de amostras em intervalos								
	<i>n</i>	< 10 ⁵ ^a	10 ⁵ – 10 ⁶	10 ⁶ – 10 ⁷	10 ⁷ – 10 ⁸	≥ 10 ⁸	Intervalo ^b	Média ^b
Fruta fresca cortada	42	0	2,4	4,8	19	73,8	5,9-11,3	8,6
Maçã	6	0	0	0	50	50	7,7-11,3	8,5
Abacaxi	6	0	0	33,3	50	16,7	6,7-8,2	7,4
Manga	6	0	0	0	16,7	83,3	7,6-10	8,6
Mamão/Papaia	6	0	0	0	16,7	83,3	7,8-8,8	8,4
Melão	6	0	16,6	0	0	83,3	5,9-9,3	8,5
Meloa cantaloupe	6	0	0	0	0	100	9,1-9,5	9,3
Meloa gália	6	0	0	0	0	100	8,8-9,6	9,3

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de produto

Relativamente às contagens de bactérias ácido-láticas (BAL) pode observar-se que estas variaram entre 3,6 e 10,7 Log UFC/g (Tabela 15). Cerca de 32,4 % das amostras

estudadas apresentou valores entre 10^7 e 10^8 UFC/g. A fruta que apresentou um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foi o abacaxi (4,7 Log UFC/g) e a que apresentou o nível médio mais elevado foi o melão (8,5 Log UFC/g), seguido da meloa *cantaloupe* (8,1 Log UFC/g).

Tabela 15 – Bactérias ácido lácticas em fruta minimamente processada contadas após o prazo de validade ter sido ultrapassado

Percentagem de amostras em intervalos								
	<i>n</i>	$< 10^5$ ^a	$10^5 - 10^6$	$10^6 - 10^7$	$10^7 - 10^8$	$\geq 10^8$	Intervalo ^b	Média ^b
Fruta fresca cortada	34	11,8	8,8	23,5	32,4	23,5	3,6-10,7	7,2
Maçã	4	0	25	0	75	0	5,5-7,7	7,0
Abacaxi	6	66,6	16,7	16,7	0	0	3,6-6,2	4,7
Manga	5	0	20	20	40	20	5,5-8,2	7,1
Mamão/Papaia	4	0	0	50	25	25	7,6-8,9	7,6
Melão	6	0	0	0	33,3	66,7	7,4-10,7	8,5
Meloa cantaloupe	5	0	0	40	20	40	6,6-10,2	8,1
Meloa gália	4	0	0	50	50	0	6,6-7,8	7,1

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de produto

As contagens dos fungos (bolores e leveduras) variaram entre 5,0 e 9,0 Log UFC/g (Tabela 16). Cerca de 35,7 % das amostras estudadas apresentou valores de fungos entre 10^7 e 10^8 UFC/g. A fruta que apresentou um nível médio mais baixo de fungos foi a manga (6,3 Log UFC/g), seguida da meloa *cantaloupe* (6,4 Log UFC/g) e a que apresentou o nível médio mais elevado foi a maçã (7,5 Log UFC/g), seguida do abacaxi (7,4 Log UFC/g).

Tabela 16 – Fungos em fruta minimamente processada contados após o prazo de validade ter sido ultrapassado

Percentagem de amostras em intervalos								
	<i>n</i>	$< 10^5$ ^a	$10^5 - 10^6$	$10^6 - 10^7$	$10^7 - 10^8$	$\geq 10^8$	Intervalo ^b	Média ^b
Fruta fresca cortada	42	0	21,4	31	35,7	11,9	5,0-9,0	6,9
Maçã	6	0	0	16,7	66,6	16,7	6,5-8,0	7,5
Abacaxi	6	0	0	33,3	50	16,7	6,7-8,5	7,4
Manga	6	0	50	16,7	16,7	16,7	5,0-9,0	6,3
Mamão/Papaia	6	0	16,7	50	33,3	0	6,1-7,5	6,6
Melão	6	0	33,3	16,7	33,3	16,7	5,8-8,4	7,0
Meloa cantaloupe	6	0	16,7	66,6	16,7	0	5,2-7,1	6,4
Meloa gália	6	0	33,3	16,7	33,3	16,7	5,5-8,8	6,7

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de produto

No que diz respeito às bactérias da família *Enterobacteriaceae*, mais especificamente os coliformes, observou-se que as contagens variaram entre 0,0 e 7,9 Log UFC/g (Tabela 17) e cerca de 50 % das amostras estudadas continha valores de bactérias coliformes inferiores a 10^5 UFC/g. A fruta que apresentou um nível médio mais baixo deste tipo de microbiota foi o abacaxi (2,0 Log UFC/g) e a que apresentou o nível médio mais elevado foi o mamão/papaia (6,5 Log UFC/g), seguida da maçã (6,3 Log UFC/g). Três das amostras de abacaxi estudadas não continham bactérias coliformes.

Tabela 17 – Coliformes em fruta minimamente processada contados após o prazo de validade ter sido ultrapassado

Percentagem de amostras em intervalos								
	<i>n</i>	$< 10^5$ ^a	$10^5 - 10^6$	$10^6 - 10^7$	$10^7 - 10^8$	$\geq 10^8$	Intervalo ^b	Média ^b
Fruta fresca cortada	41	48,8	17,1	19,5	14,6	0	0,0-7,9	4,9
Maçã	6	16,7	0	66,6	16,7	0	4,3-7,0	6,3
Abacaxi	6	100	0	0	0	0	0,0-4,5	2,0
Manga	6	83,3	0	16,7	0	0	2,7-6,6	4,1
Mamão/Papaia	6	16,7	16,7	0	66,6	0	4,2-7,9	6,5
Melão	5	20	20	40	20	0	3,7-7,2	5,6
Meloa cantaloupe	6	50	33,3	16,7	0	0	3,7-6,5	5,0
Meloa gália	6	50	50	0	0	0	2,6-5,8	4,6

n: número de amostras

a: intervalos em UFC/g de produto

b: Log UFC/g de produto

4.3. Qualidade microbiológica de fruta minimamente processada antes e depois de expirado o prazo de validade: comparação

Maçã

No estudo da avaliação da qualidade microbiológica da maçã, realizado após o prazo de validade indicado na embalagem ter sido ultrapassado, obtiveram-se valores dos parâmetros microbiológicos semelhantes aos obtidos antes de expirado o referido prazo, com exceção do número de leveduras que atingiu $7,5 \pm 0,6$ Log UFC/g, valor significativamente diferente (teste *t-student*, $p < 0,05$). Observou-se ainda que o número de psicotróficos foi o mais elevado na maçã fatiada analisada após o prazo de validade (figura 12).

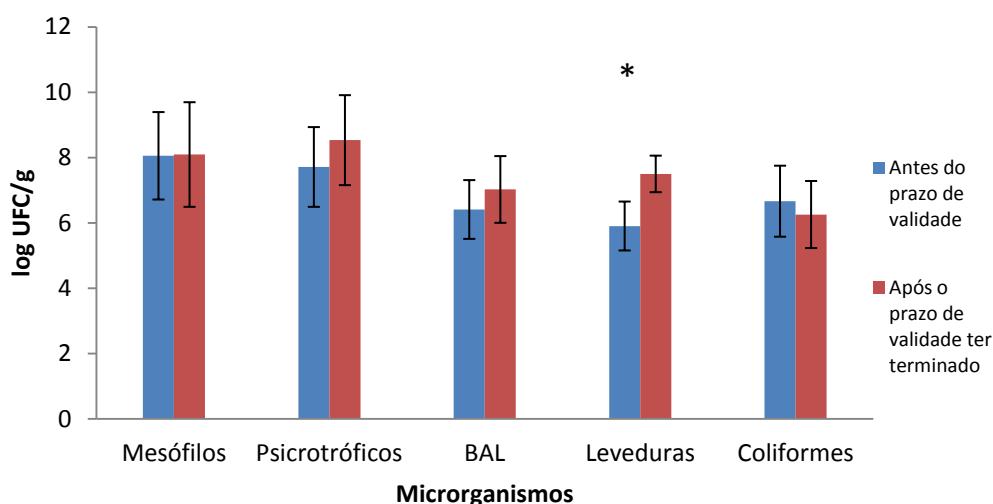


Figura 12 – Parâmetros microbiológicos de maçã minimamente processada determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado (média \pm desvio padrão) * teste *t student*, $p < 0,05$

Abacaxi

A avaliação da qualidade microbiológica do abacaxi realizada depois de expirado o prazo de validade permitiu obter valores, dos parâmetros microbiológicos, ligeiramente superiores aos determinados antes do prazo de validade ter sido ultrapassado, com exceção dos coliformes (Figura 13). Contudo, apenas as diferenças encontradas nos parâmetros leveduras e microrganismos psicotróficos têm significado estatístico (teste *t-student*, $p < 0,05$), tendo-se obtido valores muito próximos de $7,43 \pm 0,65$ Log UFC/g e $7,40 \pm 0,56$ Log UFC/g, respetivamente.

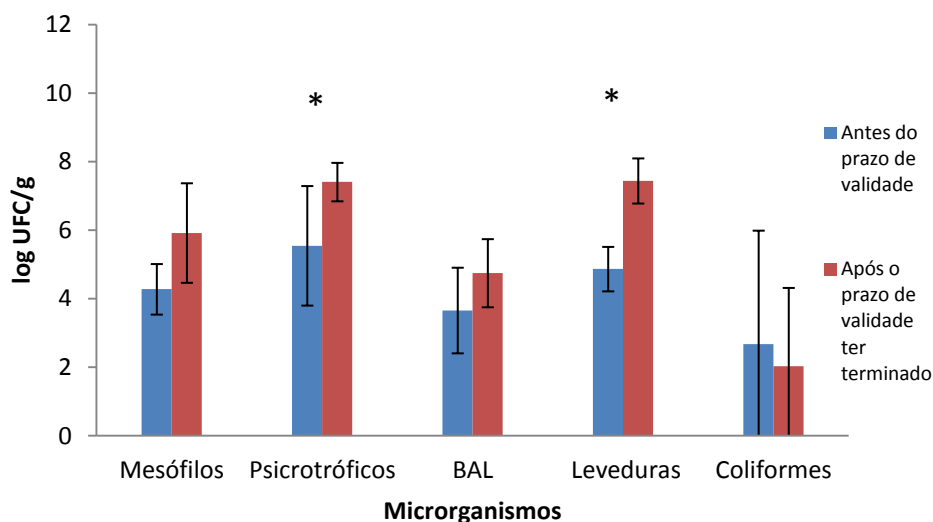


Figura 13 - Parâmetros microbiológicos de abacaxi minimamente processado determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado (média \pm desvio padrão) * teste *t student*, $p < 0,05$

Manga

No estudo da avaliação da qualidade microbiológica da manga realizado depois de ultrapassado o prazo de validade, os valores encontrados foram semelhantes aos obtidos antes do prazo de validade expirar, exceto para o parâmetro microrganismos psicrotróficos. O número de microrganismos psicrotróficos contados na manga depois do prazo de validade ter sido ultrapassado foi de $8,59 \pm 0,80$ Log UFC/g, valor que foi considerado estatisticamente diferente (teste *t-student*, $p < 0,05$) do determinado antes de terminar o período de validade $5,31 \pm 0,93$ Log UFC/g (Figura 14).

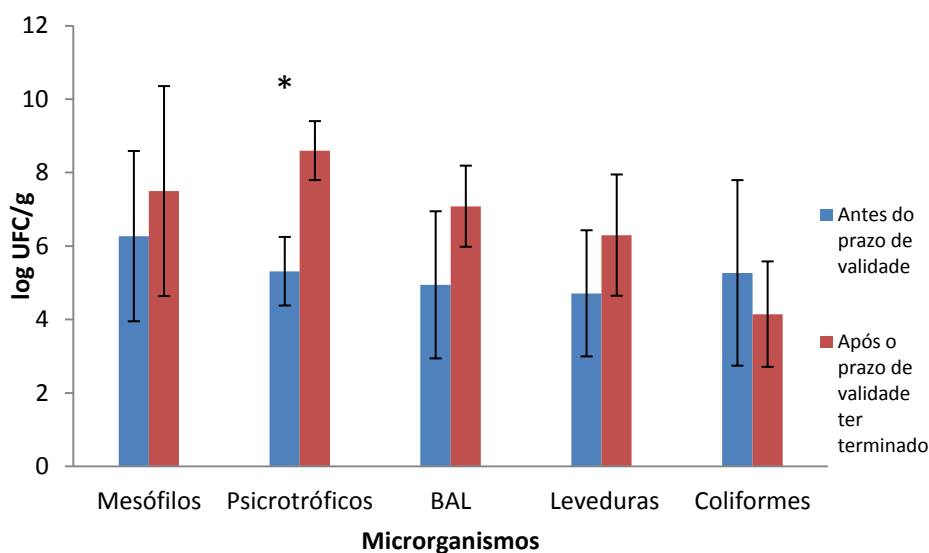


Figura 14 - Parâmetros microbiológicos de manga minimamente processada determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado (média \pm desvio padrão) * teste *t student*, $p < 0,05$

Mamão / Papaia

No estudo da avaliação da qualidade microbiológica do mamão/papaia minimamente processado, realizado após o prazo de validade ter sido ultrapassado, os números dos microrganismos aeróbios mesófilos, dos microrganismos aeróbios psicrotróficos e das BAL foram de $7,66 \pm 1,66$ Log UFC/g, $8,40 \pm 0,40$ Log UFC/g e $7,57 \pm 0,96$ Log UFC/g, respetivamente. Estes valores foram considerados estatisticamente diferentes (teste *t-student*, $p < 0,05$) dos encontrados antes do prazo de validade ter terminado $5,21 \pm 1,25$ Log UFC/g, $5,33 \pm 1,92$ Log UFC/g e $5,67 \pm 1,36$ Log UFC/g respetivamente (Figura 15).

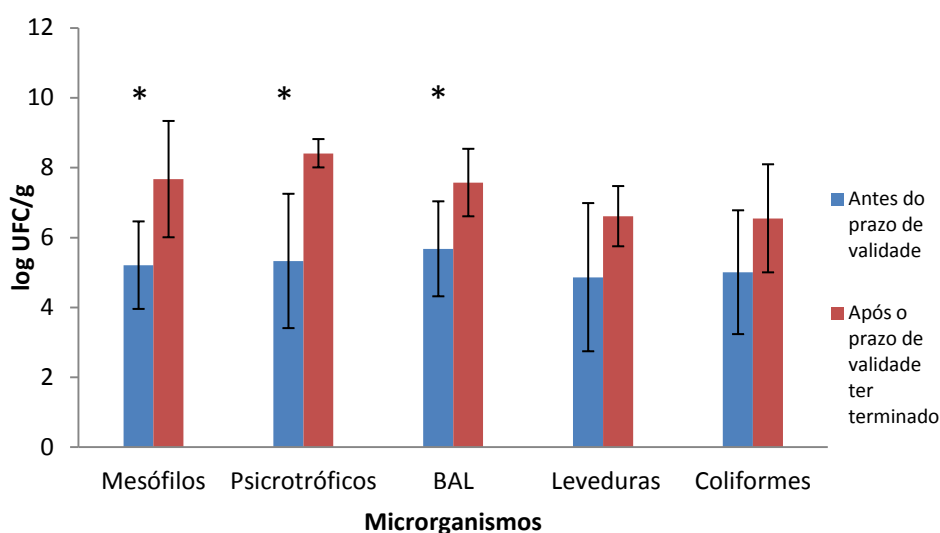


Figura 15 - Parâmetros microbiológicos de mamão/papaia minimamente processado determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado (média \pm desvio padrão) * teste *t student*, $p < 0,05$

Melão

No estudo da avaliação da qualidade microbiológica do melão minimamente processado, realizado após o prazo de validade ter sido ultrapassado, os números dos microrganismos aeróbios psicrotróficos, das BAL e dos fungos (leveduras) foram de $8,52 \pm 1,32$ Log UFC/g, $8,53 \pm 1,21$ Log UFC/g e $7,01 \pm 1,00$ Log UFC/g respetivamente. Estes valores foram considerados estatisticamente diferentes (teste *t-student*, $p < 0,05$) dos encontrados antes do prazo de validade ter terminado $5,40 \pm 0,92$ Log UFC/g, $5,15 \pm 1,84$ Log UFC/g e $3,83 \pm 0,50$ Log UFC/g respetivamente (Figura 16).

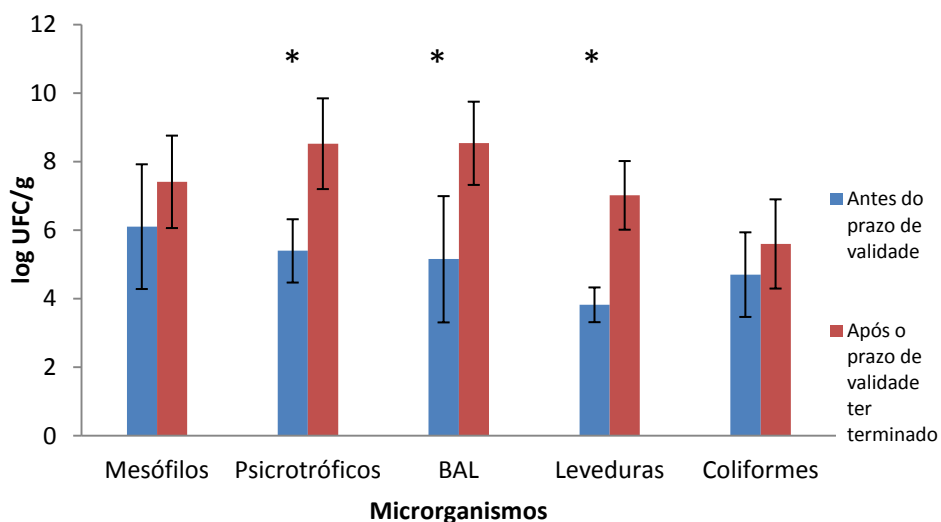


Figura 16 - Parâmetros microbiológicos de melão minimamente processado determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado (média \pm desvio padrão) * teste *t student*, $p < 0,05$

Melo *cantaloupe*

No estudo da avaliação da qualidade microbiológica do melo *cantaloupe* minimamente processado, realizado após o prazo de validade ter sido ultrapassado, os números dos microrganismos aeróbios mesófilos, dos microrganismos aeróbios psicotróficos e das BAL foram de $7,54 \pm 1,15$ Log UFC/g, $9,29 \pm 0,14$ UFC/g e $8,10 \pm 1,71$ Log UFC/g respectivamente. Estes valores foram considerados estatisticamente diferentes (teste *t-student*, $p < 0,05$) dos encontrados antes do prazo de validade ter terminado $5,50 \pm 0,69$ Log UFC/g, $6,21 \pm 2,51$ Log UFC/g e $4,27 \pm 1,06$ Log UFC/g respectivamente (Figura 17).

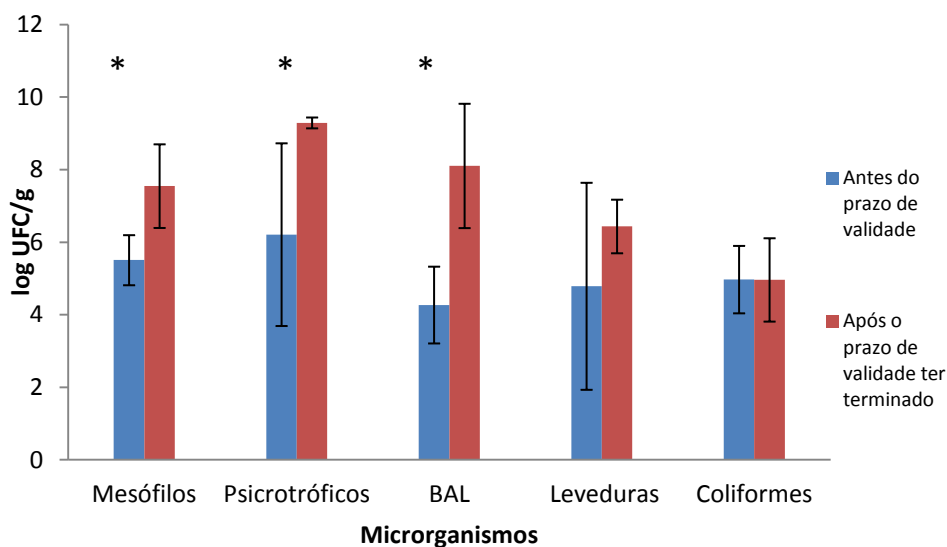


Figura 17 - Parâmetros microbiológicos de meloa *cantaloupe* minimamente processada determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado (média \pm desvio padrão) * teste *t student*, $p < 0,05$

Meloa Gália

No estudo da avaliação da qualidade microbiológica do meloa gália minimamente processado, realizado após o prazo de validade ter sido ultrapassado, os números dos microrganismos aeróbios mesófilos, dos microrganismos aeróbios psicrotróficos e das BAL foram de $7,70 \pm 1,46$ Log UFC/g, $9,25 \pm 0,41$ Log UFC/g e $7,05 \pm 0,53$ Log UFC/g respetivamente. Estes valores foram considerados estatisticamente diferentes (teste *t-student*, $p < 0,05$) dos encontrados antes do prazo de validade ter terminado $5,16 \pm 0,59$ Log UFC/g, $5,99 \pm 2,43$ Log UFC/g e $3,88 \pm 0,99$ Log UFC/g respetivamente (Figura 18).

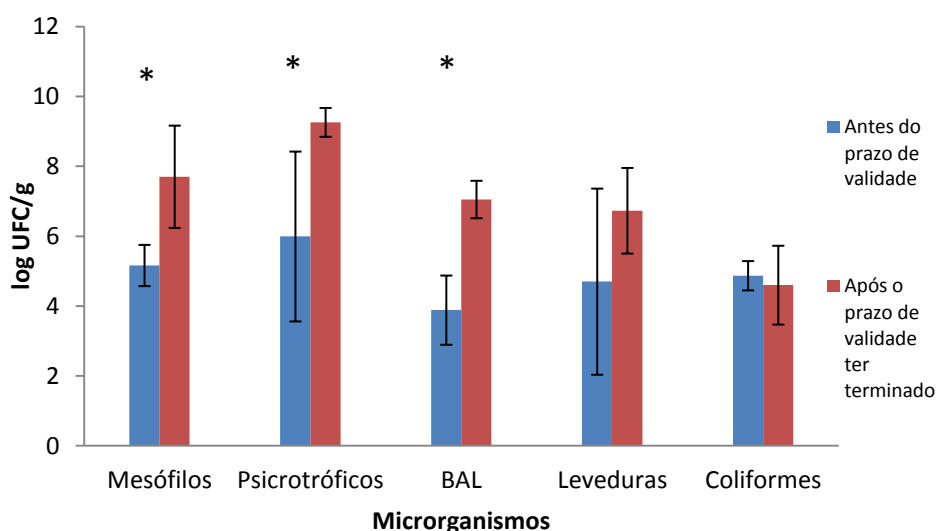


Figura 18 - Parâmetros microbiológicos de meloa gália minimamente processada determinados antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado (média \pm desvio padrão) * teste *t student*, $p < 0,05$

4.4. Microrganismos patogénicos

No que diz respeito à pesquisa de microrganismos patogénicos, encontraram-se 33 amostras de fruta, presumivelmente, contaminadas com bactérias patogénicas (Tabela 18).

Tabela 18 – Isolados de microrganismos patogénicos presuntivos nas amostras de fruta minimamente processada analisadas

Amostras	n	Número (Percentagem %) de amostras com colónias presuntivas				Número (Percentagem %) de amostras positivas confirmadas (PCR)		
		<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. aureus</i>	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> sp.
Maçã	6	ND	1(16,6)	ND	ND	ND	ND	ND
Abacaxi	6	ND	2(33,3)	1(16,6)	ND	ND	ND	ND
Manga	6	ND	4(66,6)	ND	ND	ND	ND	ND
Mamão/Papaia	6	ND	5(83,3)	4(66,6)	2(33,3)	ND	ND	ND
Melão	6	1(16,6)	3(50)	1(16,6)	ND	ND	ND	ND
Meloa cantaloupe	6	1(16,6)	ND	2(33,3)	1(16,6)	1(16,6)	ND	ND
Meloa Gália	6	ND	4(66,6)	1(16,6)	ND	ND	ND	ND
Total	42	2 (4,8)	19 (45)	9 (21,4)	3 (7,1)	1(2,4)	0	0

n: Número de amostras
ND: não detetado

Staphylococcus aureus

A bactéria da espécie *Staphylococcus aureus* foi detetada em 3 das amostras de fruta analisadas, duas de mamão/papaia e uma de meloa *cantaloupe*. Após o prazo de validade da fruta ter sido ultrapassado não se detetou *S. aureus*. Posteriormente, procedeu-se à confirmação da presença de colónias típicas (Figura 19).

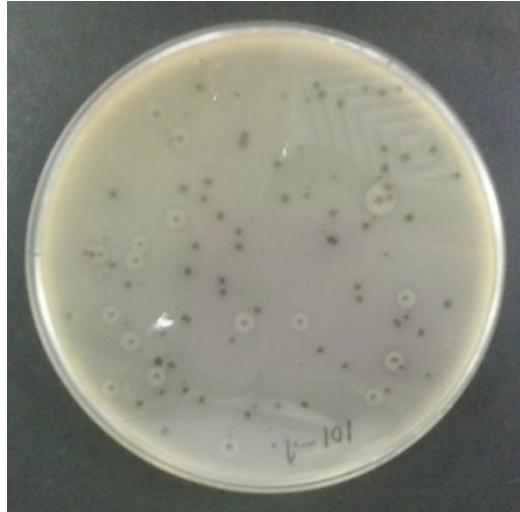


Figura 19 - Placa com meio de cultura *Baird Parker*, com colónias com características de *Staphylococcus* coagulase positivos

Salmonella

A presença presuntiva de *Salmonella* sp. foi detetada em 9 amostras de fruta analisada (abacaxi, mamão/papaia, melão, meloa *cantaloupe* e meloa gália). Posteriormente, procedeu-se à confirmação molecular da presença de colónias típicas (Figura 20) e nenhum dos isolados obtidos das amostras de fruta foi confirmado como pertencente ao género *Salmonella*.



Figura 20 - Placa com meio de cultura *Brilliance Salmonella Agar base*, com colónias roxas (típicas de *Salmonella* sp.)

Listeria monocytogenes

A presença presuntiva de *Listeria monocytogenes* foi detetada em 19 amostras (maçã, abacaxi, manga, mamão/papaia, melão e meloa gália). Posteriormente, procedeu-se à confirmação molecular da presença de colónias típicas (Figura 21), mas nenhum dos isolados foi confirmado como pertencente à espécie *L. monocytogenes*.

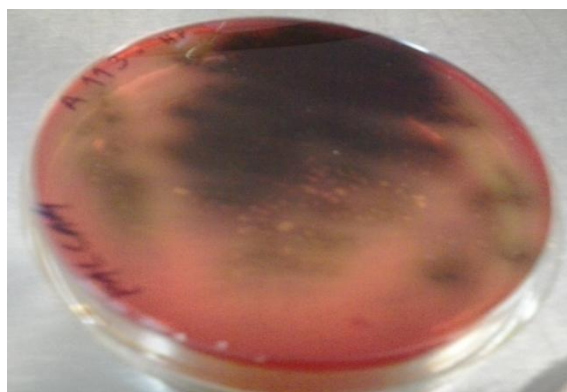


Figura 21 - Placa com meio de cultura Palcam com colónias escuras com halos escuros. (Colónias típicas de *Listeria*)

Cronobacter sakazakii

A presença presuntiva de *Cronobacter sakazakii* foi detetada em 2 amostras de fruta (melão e meloa *cantaloupe*). Posteriormente, procedeu-se à confirmação molecular das

colónias típicas (Figura 22) e apenas uma, isolada de meloia *cantaloupe*, foi confirmada como pertencente a *C. sakazakii*.

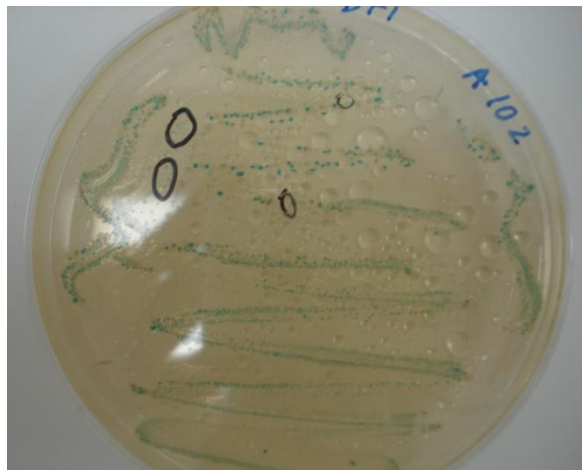


Figura 22 - Placa com meio de cultura DFI, com colónias azuis (típicas de *C. sakazakii*)

Com base nas técnicas de microbiologia clássicas obtiveram-se dois isolados identificados como pertencentes à espécie *Cronobacter sakazakii*. Contudo, quando se realizaram os testes de confirmação baseados nas técnicas de PCR descritas no capítulo Materiais e métodos, apenas 1 se confirmou como pertencente à referida espécie. Numa primeira fase, certificou-se a sua inclusão no género *Cronobacter* (Figura 23) pois o produto da amplificação da bactéria isolada de meloia *cantaloupe*, amostra 129, (Figura 23- Lane K) possuía um peso molecular de cerca de 1700 bp, tal como esperado. Posteriormente, confirmou-se a sua identificação relativamente à espécie pois a amplificação com os *primers* específicos permitiram obter um amplificado com cerca de 514 pb característico de *C. sakazakii* (Figura 24- Lane 3).

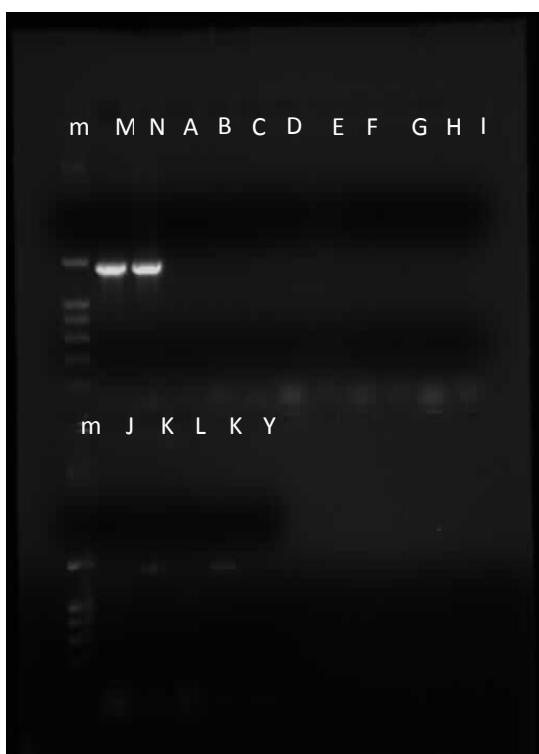


Figura 23 - Identificação do género *Cronobacter* por PCR. Marcador de peso molecular-Lane m (200 bp), Controlo positivo (B23 e B24) - M e N, Amostras- A, B, C, D, E, F, G, H I, J, K, L, Branco -Y



Figura 24 – Identificação da espécie *C. sakazakii* por PCR. Lane m ao marcador de peso molecular (200 bp), 1 (A129 5 cmal), 2 (B24 cmal), Y (branco), 3 (A129 5 csak), 4 (B24 csak)

4.5. Determinação do pH

Os valores de pH, medidos na fruta minimamente processada estudada, antes e depois de expirado o prazo de validade estão representados na tabela 19.

Tabela 19 - Resultados de pH da fruta minimamente processada antes e após o prazo de validade ter sido ultrapassado

Fruta	Valores pH (média \pm desvio padrão)	
	Antes do prazo de validade	Após o prazo de validade ter terminado
maçã	4,1 \pm 0,2	4,3 \pm 0,2
abacaxi	4,0 \pm 0,2	4,1 \pm 0,1
manga ^a	4,7 \pm 0,3	4,1 \pm 0,3
mamão/papaia ^a	5,8 \pm 0,2	5,0 \pm 0,2
Melão ^a	6,6 \pm 0,2	5,9 \pm 0,5
melo <i>cantaloupe</i> ^a	7,2 \pm 0,2	5,7 \pm 0,5
melo <i>gália</i> ^a	6,9 \pm 0,1	5,3 \pm 0,3

a: valores de pH estatisticamente diferentes (teste *t-student*, $p < 0,05$)

Os valores do pH das diferentes frutas variam entre 4 e 7. Na manga, mamão/papaia, melão, melo *cantaloupe* e melo *gália* os valores do pH determinados antes do prazo de validade ter expirado foram superiores aos medidos após essa data, sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas (teste *t-student*, $p < 0,05$). No caso da maçã e do abacaxi os valores de pH medidos antes e depois de ultrapassado o prazo de validade não apresentaram diferenças significativas (teste *t-student*, $p > 0,05$).

5. Discussão

O presente estudo integrou-se no projeto “PTDC/AGR-ALI/111687/2009-Novas abordagens para o controlo da contaminação por microrganismos patogénicos e aumento da segurança e qualidade da fruta fresca cortada” e teve como principais objetivos caracterizar a fruta minimamente processada disponível no mercado no que diz respeito aos parâmetros microbiológicos seguintes: microrganismos aeróbios mesófilos, microrganismos aeróbios psicrotróficos, bactérias ácido-lácticas (BAL), fungos filamentosos (bolores e leveduras) e coliformes. Foi também realizada a pesquisa de microrganismos patogénicos, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Cronobacter sakazakii* e *Staphylococcus aureus*. Foram estudadas 42 amostras de fruta minimamente processada (maçã, abacaxi, manga, mamão/papaia, melão, meloa *cantaloupe* e meloa gália) antes e depois de expirado o prazo de validade.

Nos últimos anos tem-se observado um aumento de vegetais e fruta minimamente processados disponíveis no mercado. A preparação de fruta fresca cortada implica operações de lavagem, descasque e corte, as quais podem contribuir para a contaminação dos alimentos. Tendo em conta o facto de não existirem estudos que refiram a qualidade microbiológica da fruta minimamente processada em Portugal e de este tipo de alimentos poderem ser veículos de microrganismos patogénicos e/ou degradadores, tornou-se pertinente a realização do presente estudo.

As 42 amostras de fruta estudadas revelaram valores médios de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos de 5,8 e 5,9 Log UFC/g, respetivamente. No que diz respeito às populações de bactérias ácido-lácticas (BAL), fungos e coliformes foram registados valores médios de 4,9, 4,8 e 4,9 Log UFC/g, respetivamente. Os valores encontrados no presente estudo são superiores aos reportados por Abadias *et al.* (2008), em Espanha na região de Lérida, que variam entre 3,8 Log UFC/g e 3,0 Log UFC/g. Contudo, nenhuma das amostras estudadas apresentava sinais de degradação.

A enumeração dos diferentes grupos microbiológicos em fruta quando esta apresentava sinais de degradação (após o prazo de validade ter sido ultrapassado) permitiu observar um aumento dos valores médios das populações microbianas. Assim, contaram-se 7,4 e 8,6 Log UFC/g de microbiota mesófila e psicrotrófica, respetivamente e 7,2 e 6,9 Log UFC/g de BAL e fungos, respetivamente. O número médio de coliformes contados antes e depois de ultrapassado o prazo de validade foi idêntico (4,9 Log UFC/g).

38,5 % das amostras de fruta minimamente processada estudadas no presente trabalho, revelaram um número de microrganismos mesófilos, inferior a 10^5 UFC/g (Tabela 8). Abadias *et al.* (2008) obtiveram, para o mesmo grupo microbiano, valores inferiores a 10^5 UFC/g em 90,4% das amostras de fruta analisadas. Nesse mesmo estudo foram analisadas amostras de vegetais minimamente processados em que contagens de mesófilos totais de 10^7 a 10^8 UFC/g foram observadas em 47,9% das amostras. Num ensaio realizado, por Santos *et al.* (2012) em saladas, contagens de microrganismos aeróbios mesófilos totais superiores a 10^6 UFC/g foram atingidas em 71,47% das amostras analisadas. Em contrapartida, Seow *et al.* (2012), obtiveram valores de microrganismos aeróbios mesófilos inferiores (3,4 Log UFC/g) em 33,3 % das amostras de maçã fresca inteira e 4,0 Log UFC/g em 9,1 % das amostras de manga fresca inteira comercializada em Singapura ($p > 0,05$). A fruta minimamente processada encontra-se, em geral, mais contaminada microbiologicamente do que a fruta fresca inteira, devido ao facto de estar mais exposta a microrganismos durante o processo de fabrico. Estas frutas são expostas a diferentes condições durante o seu processamento, embalagem e distribuição que podem condicionar e/ou aumentar a sua contaminação natural.

Em relação às contagens de microrganismos psicrotróficos, observou-se que 33,3%, das amostras, apresentaram números inferiores a 10^5 UFC/g (Tabela 9). Santos *et al.* (2012) obtiveram uma percentagem superior (62%) de amostras de saladas com níveis de microrganismos psicrotróficos entre 10^6 e 10^7 UFC/g, enquanto Abadias *et al.* (2008) constataram que 85,7% das amostras de fruta minimamente processada tinham uma carga microbiana inferior a 10^5 UFC/g. Oliveira *et al.* (2011) realizaram um estudo de avaliação da qualidade microbiológica de vegetais minimamente processados comercializados no Brasil e encontraram contaminações por microrganismos psicrotróficos superiores a 10^5 UFC/g em 96,7% das amostras analisadas. Seow *et al.* (2012), em Singapura, detetaram contaminações por microrganismos psicrotróficos inferiores a 3 Log UFC/g em 66,7 % das amostras de maçã fresca inteira e em todas as amostras de manga fresca inteira.

Na maior parte dos estudos verifica-se que o número de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos é semelhante e muitos microrganismos são capazes de crescer a temperaturas de armazenamento. O armazenamento a temperaturas de refrigeração geralmente determina o crescimento de microrganismos psicrotróficos, incluindo as *Pseudomonas* pectinólíticas. Porém, alguns microrganismos mesofílicos podem

continuar a crescer a baixas temperaturas, embora com uma taxa de crescimento baixa (Abadias *et al.*, 2008).

No que diz respeito às bactérias ácido-lácticas (Tabela 10), 58,5 % das amostras de fruta estudadas no presente trabalho continham valores inferiores a 10^5 UFC/g. No estudo realizado por Abadias *et al.* (2008), 100 % das amostras de fruta minimamente processadas, apresentaram um nível de BAL médio de 10^3 UFC/g. Apesar das BAL poderem incluir espécies responsáveis pela degradação da fruta, algumas investigações reportam a sua utilização como agentes de controlo biológico em fruta fresca minimamente processada. Estas bactérias produzem ácido láctico e bacteriocinas que inibem o crescimento de microbiota acompanhante.

Relativamente às contagens dos fungos filamentosos e leveduras, constatou-se que 69 % das amostras de fruta minimamente processada, adquiridas no Algarve, continham populações de leveduras inferiores a 10^5 UFC/g (Tabela 11), não tendo sido detetados fungos filamentosos. No estudo realizado por Abadias *et al.* (2008), 95,2 % das amostras de fruta apresentaram um nível de bolores e leveduras inferior a 10^5 UFC/g e 45,3 % dos vegetais apresentaram crescimento de bolores e leveduras entre 10^5 e 10^6 UFC/g. Tournas *et al.* (2006) contaram valores de leveduras superiores a 10^6 UFC/g em meloa *cantaloupe*, ananás e melancia. Estes autores referem que os frutos inteiros contêm populações de leveduras inferiores a 10^3 UFC/g o que indica que a contaminação por leveduras poderá ocorrer durante as fases de processamento da fruta.

No que diz respeito ao número de bactérias coliformes enumeradas na fruta analisada, contou-se um número inferior a 10^5 UFC/g em 54,8 % das amostras. Porém, apenas numa amostra de abacaxi não foram detetadas bactérias do grupo coliformes (Tabela 12). Deve referir-se que não foram detetadas bactérias da espécie *E.coli* em nenhuma das frutas estudadas. Abadias *et al.* (2008), obtiveram níveis médios de enterobactérias de 3,0 Log UFC/g e Oliveira *et al.* (2011), reportaram um número coliformes acima de 3 Log UFC/g em 81,5 % de amostras de vegetais minimamente processados comercializados no Brasil. No estudo efetuado por Seow *et al.* (2012), obtiveram-se valores inferiores a 2 Log UFC/g em todas as amostras de maçã fresca inteira e em 70 % das amostras de manga fresca inteira analisadas. No que diz respeito aos coliformes, a fruta fresca cortada estudada contém níveis de bactérias coliformes mais elevados do que a fruta fresca inteira.

Relativamente à pesquisa de microrganismos patogénicos verificou-se que nenhuma das amostras de fruta fresca cortada estava contaminada com *Salmonella* sp. ou *L. monocytogenes*. No entanto, confirmou-se a presença de *C. sakazakii* numa amostra de meloa *cantaloupe* e 7,1 % de amostras continham estafilococos “coagulase positivos” em números de 3,0 a 3,9 Log UFC/g. A presença de *S. aureus* nos alimentos é sempre preocupante não só porque se trata de uma bactéria patogénica como também porque pode estar relacionada com o manuseamento inadequado da fruta por manipuladores contaminados.

No estudo efetuado por Abadias *et al.* (2008) em fruta MP também não foram detetados *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. O mesmo se verificou nos trabalhos de Seow *et al.* (2012), onde também não foram detetadas *E. coli* e *Salmonella* sp em fruta fresca inteira comercializada em Singapura. No entanto no trabalho publicado por Santos *et al.* (2012) foi detetada a presença valores inferiores a 10 UFC/g de *Listeria monocytogenes* em 98,7 % das saladas prontas a comer comercializadas em Portugal.

Raybaudi-Massilia, *et al.* (2009), determinaram contagens iniciais e finais de *Salmonella* spp. de 2,0 e 1,6 Log UFC/g em a meloa *cantaloupe*, a uma temperatura de 5 °C, durante 24 horas de armazenamento. No mesmo estudo a maçã (Golden delicious) apresentou contagens iniciais e finais de *Salmonella* Chester de 5,5 e 5,3 Log UFC/g, a uma temperatura de 8 °C durante 66 horas de armazenamento. A papaia apresentou contagens iniciais e finais de *L. monocytogenes* de 2,5 e 4,7 Log UFC/g, a uma temperatura de 10 °C durante 168 horas de armazenamento.

6. Conclusão

No presente trabalho estudou-se a qualidade microbiológica de fruta minimamente processada comercializada no Algarve. Os resultados obtidos revelaram níveis relativamente elevados dos diferentes grupos de microrganismos analisados, nomeadamente microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos, bactérias ácido-lácticas (BAL), fungos filamentosos (bolores e leveduras) e coliformes o que aponta o potencial da fruta minimamente processada como veículo de microrganismos. A fruta que apresentou maior nível de contaminação microbiológica, foi a maçã (microrganismos aeróbios mesófilos de 8,1 Log UFC/g, microrganismos aeróbios psicrotróficos de 7,7 Log UFC/g, BAL de 6,4 Log UFC/g, fungos 5,9 Log UFC/g e coliformes 6,7 Log UFC/g.). A fruta estudada em que se obteve valores mais baixos de contaminação microbiológica foi o abacaxi (microrganismos aeróbios mesófilos de 4,3 Log UFC/g, microrganismos aeróbios psicrotróficos de 5,5 Log UFC/g, BAL de 3,7 Log UFC/g, Fungos 4,9 Log UFC/g e coliformes 2,7 Log UFC/g).

Não foram detetadas bactérias do género *Salmonella* sp. e da espécie *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras de fruta fresca cortada.

Relativamente às bactérias da família *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* não foi detetada em nenhuma das amostras mas, *Cronobacter sakazakii* foi encontrada numa das amostras de meloa *cantaloupe*. O grupo microbiano designado por coliformes foi enumerado em 97,6% das amostras de fruta minimamente processadas estudadas.

A presença de coliformes em quase todas as amostras de fruta analisadas e de *Staphylococcus aureus* em 7,1 % das amostras indica a importância de aumentar o controlo microbiológico em determinados pontos da cadeia de produção de fruta minimamente processada e a necessidade de melhorar as medidas de higiene a adotar durante o processamento, a distribuição e a venda deste tipo de alimentos.

De acordo com os regulamentos da Comissão Europeia Reg(CE) 2073/2005 e Reg(CE) 1441/2007 referente aos critérios microbiológicos nos alimentos, as amostras analisadas satisfazem os critérios de segurança e higiene alimentar.

Nas 42 amostras de fruta minimamente processada estudadas após o prazo de validade ter sido ultrapassado, constatou-se que os principais grupos responsáveis pela degradação foram as leveduras, no caso da maçã, os microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos e BAL no mamão/papaia e os microrganismos psicrotróficos

na manga. Relativamente ao melão, os microrganismos responsáveis pela degradação foram os microrganismos aeróbios psicrotróficos, as bactérias ácido-lácticas e as leveduras.

As indústrias de produção de fruta minimamente processada devem adotar as melhores práticas de fabrico de forma a baixar os números das diferentes populações microbianas existentes à superfície da fruta cortada com o objetivo de diminuir o risco de degradação dos alimentos e os perigos para a saúde pública dos consumidores.

Perspetivas futuras

A fruta minimamente processada é um produto cada vez mais procurado pelos consumidores mas, como foi identificado neste trabalho, pode conter populações microbianas em números elevados. Propõe-se, assim, os seguintes trabalhos futuros:

- Estudar o tempo de prateleira da fruta minimamente processada.
- Alargar o estudo a outras frutas.
- Estudar diferentes tratamentos para inibir o crescimento de microrganismos patogénicos e degradadores em fruta minimamente processada.

Referências bibliográficas

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.

Abadias, M., Alegre, I., Oliveira, M., Altisent, R., Viñas, I., 2012. Growth potential of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions. *Food Control* 27, 37-44.

Alegre, I., Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., Figge, M., Abadias, M., 2013. Control of foodborne pathogens on fresh-cut fruit by a novel strain of *Pseudomonas graminis*. *Food Microbiology* 34, 390-399.

Allen, K., Kovacevic, J., Cancarevic, A., Wood, J., Xu, J., Gill, B., Allen, J., Mesak, L., 2013. Microbiological survey of imported produce available at retail across Canada. *International Journal of Food Microbiology* 162, 135-142.

Almeida, G., Magalhães, R., Barbosa, J., Hogg, T., Teixeira, P., Equipa do Projecto, 2009. Listeriose em Portugal: 2004 – 2007. *RPDI Dezembro 2009*, vol. 5, nº3.

Barth, M., Hankinson, T. R., Zhuang, H., Breidt, F., 2009. Microbiological Spoilage of Fruits and Vegetables. In Sperber, W. H., Doyle, M. P. (Eds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety* (pp. 135-183). Springer Science+Business Media.

Baumgartner, A., Grand, M., Liniger, M., Iversen, C., 2009. Detection and frequency of *Cronobacter spp.* (*Enterobacter sakazakii*) in different categories of ready-to-eat foods other than infant formula. *International Journal of Food Microbiology* 136, 189-192.

Beuchat L. R., 1996b. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection* 59, 204-216.

Beuchat, L.R., 1998. Surface Decontamination of Fruit and Vegetables Eaten Raw: a Review. Disponível em: www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/surface_decon.pdf (acedido 4/6/2013).

Beuchat, L.R., 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and infection* 4, 413-423.

- Beuchat, L., R., Kim, H., Gurtler, J. B., Lin, L., Ryu, J., Richards, G. M., 2009. *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *International Journal of Food Microbiology* 136, 204-213.
- Bubert, A., Kohler, S., Goebel, W., 1992. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. By Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2625-2632.
- Bubert, A., Riebe, J., Schnitzler, N., Schonberg, A., Goebel, W., Schubert, P., 1997. Isolation of Catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from Listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 179-183.
- Chap, J., Jackson, P., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C., Park., J., Osaili, T., Shaker, R., Jaradat, Z., Hartantyo, S. H. P., Sani, N. A., Estuningsih, S., Forsythe, S. J., 2009. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. In follow up formulas and infant foods. *International Journal of Food Microbiology* 136, 185-188.
- Churchill, R. L. T., Lee, H., Hall, J. C., 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods* 64, 141-170.
- Corbo, M. R., Speranza, B., Campaniello, D., D'Amato, D., Sinigaglia, M., 2010. Fresh-cut fruits preservation: current status and emerging technologies. *Current Research, Technology and Educations Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2, 1143 – 1154.
- Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G., Fanning, S., 2006. *Enterobacter sakazakii*: an emerging pathogen in powdered infant formula. *Clinical Infectious Disease* 42, 996–1002.
- Fang, T., Liu, Y., Huang, L., 2013. Growth kinetics of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in fresh-cut *cantaloupe*. *Food Microbiology* 34, 174-181.
- Ferreira, W., Sousa, J., 2000. *Microbiologia*. Vol.2 LIDEL – Edições Técnicas, Lda. Lisboa.
- Ferreira, W., Sousa, J., Lima, N., 2010. *Microbiologia*. LIDEL – Edições Técnicas, Lda. Lisboa.

Francis, G. A., Gallone, A., Nychas, G. J., Sofos, J. N., Colelli, G., 2012. Factors affecting quality and safety of fresh-cut produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52, 595-610.

EFSA - The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2010, *EFSA Journal* 2012; 10(3):2597. [442pp.] doi: 10.2903/j.efsa.2012.2597. Disponível em: www.efsa.europa.eu/efsajournal (acedido 4/6/2013)

González, R. D., Tamagnini, L. M., Olmos, P. D., Sousa, G. B., 2003. Evaluation of a chromogenic médium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiology* 20, 601-604.

Hyeon, J., Park, C., Choi, I., Holt, P.S., Seo, K., 2010. Development of multiplex real-time PCR with Internal amplification control for simultaneous detection of *Salmonella* and *Cronobacter* in powdered infant formula. *International Journal of Food Microbiology* 144, 177-181.

Ibenyassine, K., Mhand, R. A., Karamoko, Y., Anajjar, B., Chouibani, M. M., Ennaji, M., 2007. Bacterial pathogens recovered from vegetables irrigated by wastewater in Morocco. *Journal of Environmental Health* 69, 47-51.

Instituto Nacional de Estatísticas (INE), 2012. Balanços de Aproveitamento de Produtos Vegetais. Consumo humano de frutos per capita (kg/ hab.) por Espécie frutícola. Disponível em: www.ine.pt (acedido a 23/5/2013).

International Fresh-cut Produce Association (IFPA), 2001. Disponível em: <http://www.creativew.com/sites/ifpa/fcf.html> (acedido a 10/9/2013).

Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H., 2007. Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Journal of Clinical Microbiology* 45, 3814-3816.

Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H., 2007a. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp.

nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. BMC Evolutionary Biology 7, 64.

Iversen, C., Mullane, N., McCardell, B., Tall, B.D., Lehner, A., Fanning, S., Stephan, R., Joosten, H., 2008. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1 and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 1442–1447.

Jofré, A., Martin, B., Garriga, M., Hugues, M., Pla, M., Rodríguez-Lázaro, D., Aymerich, T., 2005. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. Food Microbiology 22, 109-115.

Kotzekidou, P., 2013. Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits. Food Microbiology 35, 86-91.

Lamikanra, O., Chen, J. C., Banks, D., Hunter, P. A., 2000. Biochemical and Microbial changes during the storage of minimally processed *cantaloupe*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48, 5955-5961.

Lehner, A., Nitzsche, S., Breeuwer, P., Diep, B., Thelen, K., Stephan, R., 2006. Comparison of two chromogenic media and evaluation of two molecular based identification systems for *Enterobacter sakazakii* detection. BMC Microbiology 6:15. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/15> (acedido a: 10/7/2013).

Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R., 2004. 16s rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. BMC Microbiology 4:43. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/4/43> (acedido a: 10/7/2013).

Manzocco, L., Pieve, S., Maifreni, M., 2011. Impact of UV-C light on safety and quality of fresh melon. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 13-17.

Marathe, S. A., Chowdhury, R., Bhattacharya, R., Nagarajan, A. G., 2012. Direct detection of *Salmonella* without pre-enrichment in milk, ice-cream and fruit juice by PCR against *hlyA* gene. *Food Control* 23, 559-563.

Mukhopadhyay, S., Ramaswamy, R., 2012. Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International* 45, 666-677.

Norma ISO 4833:2003 (E) – Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30 °C.

Norma ISO 17410: 2001 (E) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms.

Norma BS ISO 15214:1998 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 °C.

Norma ISO 21527-1:2008 (E) - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.

Norma ISO 6888-1:1999 (E) - 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.

Norma UNE-EN ISO 6579:2002 – Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection of *Salmonella* spp.

Norma ISO 11290-1:1996 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*: Part 1. Detection method.

Nunes, P., 2012. Uma especialista em nutrição no supermercado. A esfera dos livros. Lisboa.

Olaimat, A. N., Holley, R. A., 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A Review. *Food Microbiology* 32, 1-19.

Oliveira, M. A., Souza, V. M., Bergamini, A. M. M., Martinis, E. C. P., 2011. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control* 22, 1400-1403.

Ölmez, H., Kretzschmar, U., 2009. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT – Food Science and Technology* 42, 686-693.

Penteado, A. L., Eblen, B. S., Miller, A. J., 2004. Evidence of *Salmonella* internalization into Fresh mangos during simulated postharvest insect disinfestations procedures. *Journal of Food Protection* 67, 181-184.

Penteado, A. L., Leitão, M. F. F., 2004. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya puls. *International Journal of Food Microbiology* 92, 89-94.

Quintas, C., 2011. Microorganisms and safety. Chapter III, Practical Food and Research. *Food Science and Technology*. Editor: Rui M. S. Cruz. Lisboa.

Ramos, B., Miller, F.A., Brandão, T.R.S., Teixeira, P., Silva, C.L.M., 2013. Fresh fruits and vegetables – Na overview on applied methodologies to improve its quality and safety. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.002>.

Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O., 2009. Control of Pathogenic and Spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by Traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 157-180.

Regulamento (CE) N° 1441/2007 da comissão de 5 de Dezembro de 2007 que altera o Regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*.

Sant’Ana, A. S., Barbosa, M. S., Destro, M. T., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M., 2012. Growth potential of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* in nine types of

ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology* 157, 52-58.

Santos, M., Cavaco, A., Gouveia, J., Novais, M., Nogueira, P., Pedroso, L., Ferreira, M., 2012. Evaluation of minimally processed salads commercialized in Portugal. *Food Control* 23, 275-281.

Sapers, G. M., Miller, R. L., Pilizota, V., Matrazzo, A. M., 2001. Antimicrobial treatments for minimally processed *cantaloupe* melon. *Journal of Food Science* 66, 345-349.

Seow, J., Ágoston, R., Phua, L., Yuk, H., 2012. Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control* 25, 39-44.

Silveira, A., Aguayo, E., Artés, F., 2013. Shelf-life and quality attributes in fresh-cut *Galia* melon combined with fruit juices. *LWT – Food Science and Technology* 50, 343-348.

Soliva-Fortuny, R.C., Martín-Belloso, O., 2003. New advances in extending the shelf-life of fresh-cut fruits: a review. *Trends in food Science e Technology* 14, 341-353.

Shah, N. S., Nath, N., 2006. Minimally processed fruits and vegetables – Freshness with convenience. *Journal of Food Science and Technology* 43, 227-233.

Stoop, B., Lehner, A., Iversen, C., Fanning, S., Stephan, R., 2009. Development and evaluation of *rpoB* based PCR systems to differentiate the six proposed species within the *genus Cronobacter*. *International Journal of Food Microbiology* 136, 165-168.

Strawn, L. K., Schneider, K. R., Danyluk, M. D., 2011. Microbial Safety of tropical fruits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51, 132-145.

Tournas, V. H., Heeres, J., Burgess, L., 2006. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology* 23, 684-688.

Anexo I – Amostras de fruta minimamente processada

Tabela 20 – Amostras de fruta minimamente processada, local de aquisição, prazo de validade e respetivas datas de análise

Amostras	Fruta	Local	Prazo de Validade	Antes do prazo de validade	Após o prazo de validade
95	Maçã	Guia	28/10/2012	23/10/2012	6/11/2012
96	Maçã	Vilamoura	27/10/2012	23/10/2012	6/11/2012
97	Abacaxi	Portimão	6/11/2012	6/11/2012	19/11/2012
98	Abacaxi	Portimão	6/11/2012	6/11/2012	19/11/2012
99	Manga	Almancil	14/11/2012	13/11/2012	26/11/2012
100	Manga	Almancil	14/11/2012	13/11/2012	26/11/2012
101	Mamão/Papaia	Almancil	22/11/2012	20/11/2012	4/12/2012
102	Melão	Faro	21/11/2012	20/11/2012	4/12/2012
103	Melão	Faro	23/11/2012	20/11/2012	4/12/2012
104	Meloa <i>cantaloupe</i>	Almancil	30/11/2012	27/11/2012	10/12/2012
105	Manga	Guia	28/11/2012	27/11/2012	10/12/2012
106	Manga	Guia	28/11/2012	27/11/2012	10/12/2012
107	Maçã	Faro 2	22/12/2012	11/12/2012	8/1/2013
108	Maçã	Faro 2	22/12/2012	11/12/2012	8/1/2013
109	Abacaxi	Faro 2	12/12/2012	11/12/2012	8/1/2013
110	Meloa <i>cantaloupe</i>	Almancil	17/1/2013	15/1/2013	28/1/2013
111	Meloa gália	Almancil	17/1/2013	15/1/2013	28/1/2013
112	Abacaxi	Guia	17/1/2013	15/1/2013	28/1/2013
113	Abacaxi	Guia	15/1/2013	15/1/2013	28/1/2013
114	Meloa <i>cantaloupe</i>	Almancil	24/1/2013	22/1/2013	4/2/2013
115	Manga	Guia	24/1/2013	22/1/2013	4/2/2013
116	Abacaxi	Guia	24/1/2013	22/1/2013	4/2/2013
117	Melão	Faro	1/2/2013	29/1/2013	19/2/2013
118	Melão	Faro	1/2/2013	29/1/2013	19/2/2013
119	Meloa <i>cantaloupe</i>	Almancil	1/2/2013	29/1/2013	19/2/2013
120	Melão Amarelo	Almancil	1/2/2013	29/1/2013	19/2/2013
121	Mamão/Papaia	Almancil	8/2/2013	5/2/2013	25/2/2013
122	Meloa gália	Almancil	8/2/2013	5/2/2013	25/2/2013
123	Mamão/Papaia	Almancil	8/2/2013	5/2/2013	25/2/2013
124	Meloa gália	Almancil	8/2/2013	5/2/2013	25/2/2013
125	Melão verde	Almancil	1/3/2013	26/2/2013	19/3/2013
126	Meloa <i>cantaloupe</i>	Almancil	1/3/2013	26/2/2013	19/3/2013
127	Mamão/Papaia	Almancil	1/3/2013	26/2/2013	19/3/2013

128	Meloa gália	Almancil	1/3/2013	26/2/2013	19/3/2013
129	Meloa <i>cantaloupe</i>	Almancil	7/3/2013	5/3/2013	2/4/2013
130	Meloa gália	Almancil	8/3/2013	5/3/2013	2/4/2013
131	Meloa gália	Almancil	7/3/2013	5/3/2013	2/4/2013
132	Maçã	Faro 2	12/3/2013	5/3/2013	2/4/2013
133	Maçã	Faro 2	16/3/2013	12/3/2013	9/4/2013
134	Papaia/Mamão	Almancil	15/3/2013	12/3/2013	9/4/2013
135	Mamão/Papaia	Almancil	15/3/2013	12/3/2013	9/4/2013
136	Manga	Almancil	15/3/2013	12/3/2013	9/4/2013

Anexo II – Meios de cultura

Tabela 21 – Meios de cultura utilizados

Nome	Composição (g/L):
Água Peptonada Tamponada	Peptona (10 g); Cloreto de sódio (5 g); Fosfato disódico (3,5 g); dihidrogenofosfato de potássio (1,5 g)
Plate Count Agar	Peptona de caseína (5 g); Extracto de levedura (2,5 g); Dextrose (1 g); Agar (15 g)
Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar	Peptona micológica (5 g); Dextrose (10 g); Fosfato monopotássico (1 g); Fosfato de magnésio (0,5 g); 2-6-dicloro-4-nitroanilina (0,002 g); Rosa de bengala (0,025 g); Cloranfenicol (0,1 g); Agar (15 g)
Baird parker (g/950 mL)	Triptona (10 g); Extracto de carne (5 g); Extracto de levedura (1 g); Piruvato de sódio (10 g); Glicina (12 g); Cloreto de lítio (5 g); Agar bacteriológico (15 g). Meio completo: Meio base (100 mL); Solução de telurito de potássio (1,0 mL) e Emulsão de gema de ovo (5,0 mL)
Man Rogosa e Sharpe	Peptona (10 g); Pó 'Lab – Lemco' (8 g); Extracto de levedura (4 g); Glucose (20 g); Monooleato de sorbitano (1 mL); Fosfato de hidrogénio dipotássico (2 g); Acetato de sódio trihidratado (5 g); Citrato de triamónio heptahidratado (0,2 g); Sulfato de manganês tetrahidratado (0,05 g); Agar (10 g)
Chromocult	Peptona (3 g); Cloreto de sódio (5 g); Di-hidrogenofosfato de sódio (2,2 g); Hidrogenofosfato de di-sódio (2,7 g); Triptofano (1 g); Piruvato de sódio (1 g); Tergitol 70 (15 g); Sorbitol (1 g); Agar (10 g); 6-cloro-3-indoxil-beta-D-galactopiranosida (0,2 g); Isopropil-b
EEbroth	Peptona de gelatina (10 g); Dextrose (5 g); <i>Ox-bile</i> (20 g); Fosfato di-sódio (8 g); Fosfato de monopotássio (2 g); <i>Brilliant green</i> (0,0015 g)
Duncan, Forsythe e Iversen	Triptona (15 g); Peptona de soja (5 g); Cloreto de

	sódio (5 g); Citrato férrico de amónio (1 g); Desoxicolato de sódio (1 g); Tiosulfato de sódio (1 g); Agente Cromogénico (0,1 g); Agar (15 g)
Rapapport	Peptona de soja (5 g); Cloreto de sódio (8 g); Di- hidrogenofosfato de potássio (1,6 g); Cloreto de magnésio (40 g); Verde malaquite (0,04 g)
Muller	Extracto de carne (4,3 g); Digerido enzimático de caseína (8,6 g); Cloreto de sódio (2,6 g); Carbonato de cálcio (38,7 g); Tiosulfato de sódio (anidro) (30,5 g); <i>Ox-bile</i> (4,78 g); <i>Brilliant green</i> (0,0096 g)
Brilliance	Mistura de <i>salmonella inhibigen</i> (14 g); Mistura de cromogénio (25 g); Agar (15 g)
Xylose Lysine Deoxycholate Agar	Xilose (3,5 g); L-Lisina (5 g); Lactose (7,5 g); Sacarose (7,5 g); Cloreto de sódio (5 g); Extracto de levedura (3 g); <i>Phenol red</i> (0,08 g); Deoxicolato de sódio (2,5 g); Tiosulfato de sódio (6,8 g); citrato férrico de amónio (0,8 g); Agar (15 g)
FRASER	Polipeptona (10 g); Extracto de levedura (5 g); Extracto de carne (5 g); Cloreto de sódio (20 g); Fosfato de disódio (anidro) (9,6 g); Fosfato de monopotássio (1,35 g); Esculina (1 g); Cloreto de Lítio (3 g); Ácido nalidíxico (0,02 g); Hidroclorato de acriflavina (0,025 g)
Half fraser	Polipeptona (10 g); Extracto de levedura (5 g); Extracto de carne (5 g); Cloreto de sódio (20 g); Fosfato dissódico anidro (9,6 g); Fosfato monopotássio (1,35 g); Esculin (1 g); Cloreto de Lítio (3 g); Ácido nalidíxico (10 mg); Acriflavina cloridrato (12,5 mg); Citrato de amónio e ferro (0,5 g)
PALCAM	Peptonas (23 g); Extracto de levedura (3 g); Glucose (0,5 g); amido (1 g); Cloreto de sódio (5 g); Esculina (0,8 g); Citrato de amónio férrico (0,5 g); Cloreto de lítio (15 g); D-manitol (10 g); <i>Phenol red</i> (0,08 g); Agar bacteriológico (15 g)
Tryptic Soy Agar	Peptona de caseína (15,0 g); Peptona de soja (5,0 g); Cloreto de sódio (5,0 g); Agar (15 g)
Nutrient broth	Extracto de carne (1,0 g); Extracto de levedura

	(2,0 g); Peptona (5,0 g); Cloreto de sódio (5,0 g)
Brain Heart Infusion	Extracto de cérebro (12,5 g); Extracto de coração (5,0 g); Peptona (10 g); Dextrose (2 g); Cloreto de sódio (5 g); Fosfato di-sódio (2,5 g)

Anexo III – Comunicação, sob a forma de painel apresentada, no International Food Congress “Novel Approaches in Food Industry” (NAFI 2014) que decorreu em Kusadasi - Turquia de 26 a 29 de Maio de 2014



Microbial quality and spoilage of minimally processed fruit

Lopes, J.¹, Graça, A.², Santo, D.², Quintas C.²

¹ ICAAM, Universidade do Algarve, FCT, Portugal; ² Instituto Superior de Engenharia, Campus da Penha and CIOA, Campus de Gambelas, Faro 8005-139 Portugal, cquintas@ualg.pt



Introduction

The present work aims at evaluating the microbiological quality of minimally processed fruit commercialized in southern Portugal. Forty two fresh-cut fruit samples were purchased in the Algarve and analysed before their best-before date for aerobic mesophilic and psychrotrophic microorganisms, coliforms, lactic acid bacteria (LAB), *Staphylococcus aureus* and fungi. The same number of samples were analysed after their expiration date for mesophilic and psychrotrophic microorganisms, coliforms, LAB and fungi, to evaluate which microbial group was responsible for spoilage. The safety parameters studied were *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* sp. and *Listeria* sp...

Methods

Samples were analyzed according to the methodologies in Table I. The counts of lactic acid bacteria were made inoculating by incorporation aliquots of the serial dilutions in MRS agar. The detection of *Enterobacteriaceae* and *E. coli* was performed inoculating by incorporation aliquots of the serial dilutions in Chromocult agar (Chap et al., 2009).

Table I – List of methodologies used to determine the microbial quality

Determination	Methodology	Description
Aerobic Mesophilic Count	ISO 4833:2003	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count at 30 °C
Yeast and moulds	ISO 21527:2008	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds
Staphylococcus aureus	ISO 6888:1999; And 1.2003 using Baird Parker agar medium Amendment 1: Clarification of precision data	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) – Part 1: Technique
Salmonella sp	UNE-EN ISO 6579:2002	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection of Salmonella spp.
Cronobacter sakazakii	Chap et al. 2009	International survey of Cronobacter sakazakii and other Cronobacter spp. in follow up formulas and infant foods
Listeria monocytogenes	ISO 11290:1996	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes – Part 1: Detection method
Psychrotrophic microorganisms	ISO 17410:2001	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms
Acid Lactic Bacteria	BS ISO 15214:1998	Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 °C
Coliform and E. coli	González et al., 2003	Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and Escherichia coli determination in ready-to-eat foods

Results

Table 2- Aerobic mesophilic microorganisms in fresh-cut fruit

Fresh-cut fruit	Percentage of samples in the indicated interval						Range ^b	Mean ^c
	n	<10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	>10 ⁷		
Fresh-cut fruit	39	38,5	25,6	10,3	12,8	12,8	3,8-9,9	5,8
Apple	6	0	0	16,7	50	33,3	6,3-9,9	8,1
Pineapple	4	75	25	0	0	0	3,8-5,4	4,3
Mango	6	50	0	16,7	0	33,3	4,0-9,2	6,3
Papaya	5	80	0	0	20	0	4,4-7,4	5,2
Melon	6	33,3	33,3	0	16,7	16,7	4,3-8,9	6,1
Cantaloupe melon	6	16,7	66,6	16,7	0	0	4,5-6,6	5,5
Galia melon	6	33,3	50	16,7	0	0	4,6-6,3	5,2

n: number of samples
^a: Range in cfu g⁻¹ of product
^b: Mean in log₁₀ cfu g⁻¹ of product

Table 3- Aerobic psychrotrophic microorganisms in fresh-cut fruit

Fresh-cut fruit	Percentage of samples in the indicated interval						Range ^b	Mean ^c
	n	<10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	>10 ⁷		
Fresh-cut fruit	42	33,3	28,6	11,9	16,7	9,5	3,3-10,7	5,9
Apple	6	0	0	33,3	50	16,7	6,5-10	7,7
Pineapple	6	33,3	33,3	16,7	16,7	0	4,1-6,1	5,5
Mango	6	50	33,3	0	16,7	0	4,5-7,0	5,3
Papaya	6	50	16,7	0	33,3	0	3,7-8,0	5,3
Melon	6	33,3	50	16,7	0	0	4,4-7,0	5,4
Cantaloupe melon	6	16,7	50	0	16,7	16,7	3,3-10,6	6,2
Galia melon	6	50	16,7	16,7	0	0	4,3-10,7	6,0

n: number of samples
^a: Range in cfu g⁻¹ of product
^b: Mean in log₁₀ cfu g⁻¹ of product

Table 4 – Yeasts and moulds in fresh-cut fruit

Fresh-cut fruit	Percentage of samples in the indicated interval						Range ^b	Mean ^c
	n	<10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	>10 ⁷		
Fresh-cut fruit	42	69	9,5	9,5	4,8	7,1	2,7-10,4	4,8
Apple	6	16,7	33,3	50	0	0	4,8-6,6	5,9
Pineapple	6	50	33,3	16,7	0	0	4,2-6,0	4,9
Mango	6	83,3	0	0	0	16,7	3,5-8,1	4,7
Papaya	6	66,7	0	0	33,3	0	2,7-7,5	4,9
Melon	6	100	0	0	0	0	3,3-4,6	3,8
Cantaloupe melon	6	83,3	0	0	0	16,7	2,7-4,8	4,8
Galia melon	6	83,3	0	0	0	16,7	10,4	4,7

n: number of samples
^a: Range in cfu g⁻¹ of product
^b: Mean in log₁₀ cfu g⁻¹ of product

Table 5- Enterobacteriaceae in fresh-cut fruit

Fresh-cut fruit	n	Percentage of samples in the indicated interval					Range ^b	Mean ^c
		<10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	10 ⁵ -10 ⁶	10 ⁶ -10 ⁷	>10 ⁷		
Fresh-cut fruit	42	54,8	16,7	16,7	2,4	9,5	0,0-9,1	4,9
Apple	6	0	16,7	66,6	0	16,7	5,1-8,4	6,7
Pineapple	6	83,3	0	0	0	16,7	0,0-9,1	2,7
Mango	6	66,6	0	0	0	33,3	2,9-8,4	5,3
Papaya	6	66,6	0	16,7	16,7	0	3,4-7,7	5,0
Melon	6	66,6	16,7	16,7	0	0	3,5-6,6	4,7
Cantaloupe melon	6	33,3	50	16,7	0	0	3,4-6,0	5,0
Galia melon	6	66,7	33,3	0	0	0	4,5-5,5	4,9

n: number of samples
^a: Range in cfu g⁻¹ of product
^b: Mean in log₁₀ cfu g⁻¹ of product

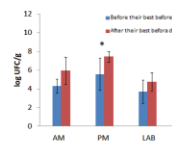


Figure 1- Comparison of aerobic mesophilic (AM), aerobic psychrotrophic (PM), lactic acid bacteria (LAB), yeasts and molds (YM) and total coliform (TC) counts in fresh cut pineapple before and after the best before date (*t student test, p<0,05)

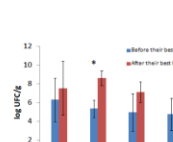


Figure 2- Comparison of aerobic mesophilic (AM), aerobic psychrotrophic (PM), lactic acid bacteria (LAB), yeasts and molds (YM) and total coliform (TC) counts in fresh cut mango before and after the best before date (*t student test, p<0,05)

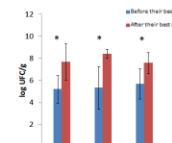


Figure 3- Comparison of aerobic mesophilic (AM), aerobic psychrotrophic (PM), lactic acid bacteria (LAB), yeasts and molds (YM) and total coliform (TC) counts in fresh cut papaya before and after the best before date (*t student test, p<0,05)

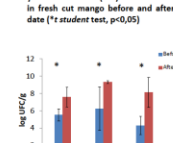


Figure 4- Comparison of aerobic mesophilic (AM), aerobic psychrotrophic (PM), lactic acid bacteria (LAB), yeasts and molds (YM) and total coliform (TC) counts in fresh cut Cantaloupe melon before and after the best before date (*t student test, p<0,05)

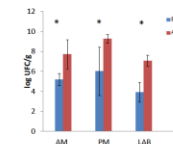


Figure 5- Comparison of aerobic mesophilic (AM), aerobic psychrotrophic (PM), lactic acid bacteria (LAB), yeasts and molds (YM) and total coliform (TC) counts in fresh cut galia melon before and after the best before date (*t student test, p<0,05)

Discussion

The aerobic mesophilic and psychrotrophic biota ranged from 3.3 to 10.7 log CFU/g. The LAB were present in numbers ranging from 3.1 log CFU/g to 9 log CFU/g and fungi were detected in smaller numbers than bacteria (values of 4.8 log CFU/g). After the expiration date a significant increase in the number of yeasts was counted in the apples and pineapples and in the levels of LAB in cantaloupe, galia, papaya and melon fresh-cuts. However, the psychrotrophs also showed a significant increase in fresh-cut mango and papaya. *Salmonella* sp. and *L. monocytogenes* were not detected in the fruit samples. *C. sakazakii* and *S. aureus* were found in a low number of samples studied and the coliforms were found in 55% of them. The presence of coliforms and *S. aureus* indicates the need of increasing hygienic practices in the fresh-cut fruit production chain and during distribution and retailing.

Acknowledgements

Foundation for Science and Technology (Fundação para a Ciência e Tecnologia) PROIECT PTDC/AGR-ALU/111687/2009 «SAFEC» and SFRH/BD/76745/2011

Trabalho realizado com o apoio:

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA