

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

LUIZ CARLOS FERREIRA

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA CONSERVAÇÃO DE POLPAS DE PEQUI
(*Caryocar brasiliense* Camb.): QUALIDADE, HIGIENE, ADAPTAÇÃO DE
BACTÉRIAS AO ESTRESSE ÁCIDO E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS COM
POTENCIAL PARA BIOCONSERVAÇÃO**

**Belo Horizonte, MG
2007**

LUIZ CARLOS FERREIRA

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA CONSERVAÇÃO DE POLPAS DE PEQUI
(*Caryocar brasiliense* Camb.): QUALIDADE, HIGIENE, ADAPTAÇÃO DE
BACTÉRIAS AO ESTRESSE ÁCIDO E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS COM
POTENCIAL PARA BIOCONSERVAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência de
Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira

**Belo Horizonte, MG
2007**

LUIZ CARLOS FERREIRA

**ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DA CONSERVAÇÃO DE
POLPAS DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.):
QUALIDADE, HIGIENE, ADAPTAÇÃO DE BACTÉRIAS AO
ESTRESSE ÁCIDO E ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS
COM POTENCIAL PARA BIOCONSERVAÇÃO**

TESE APROVADA EM 07 DE DEZEMBRO DE 2007

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. CÉLIA ALENCAR DE MORAES

Dra. ÂNGELA FROEHLICH

Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA

Dr. PAULO SÉRGIO NASCIMENTO LOPES

Dr. ROBERTO GONÇALVES JUNQUEIRA
Orientador

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, pela saudade e pelo amor;
ao professor Roberto Gonçalves Junqueira, pela amizade, aprendizado e orientação;
a comissão examinadora, pelas contribuições;
a professora Célia Alencar de Moraes; por sempre estar presente na minha formação;
a todos os professores e funcionários do Departamento de Alimentos e do PPGCA da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelas amizades e boa convivência;
aos colegas alunos do PPGCA, pela troca de experiências;
a Cooperjap (Cooperativa de Produtores e Rurais e Catadores de Pequi de Japonar-MG), pela colaboração;
ao CNPq, pelo suporte financeiro;
a minha irmã Liliane, meu cunhado Adilson e meus sobrinhos Matheus e Amanda; pela acolhida;
a todos os meus demais familiares, pelo carinho constante.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	14
REVISÃO DA LITERATURA	15
1 O pequi	15
2 Resposta dos microrganismos ao estresse no processamento de alimentos	17
2.1 Tratamento térmico	19
2.2 Acidez	21
2.3 Mecanismos de resistência ácida de microrganismos	26
2.4 Proteção cruzada	28
3 Bioconservação de alimentos	31
4 Identificação de bactérias lácticas e leveduras	34
4.1 Sistema API 50 CHL para identificação de bactérias lácticas	34
4.2 Sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC para identificação de leveduras	35
CAPÍTULO I - QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CONSERVAS DE POLPA DE PEQUI (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) COMERCIALIZADAS NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DE MINAS GERAIS	37
RESUMO	37
ABSTRACT	37
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4 CONCLUSÕES	46

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE UMA INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE CONSERVAS DE POLPA DE PEQUI NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DE MINAS GERAIS	47
RESUMO	47
ABSTRACT	48
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Coleta de amostras	50
2.2 Análises microbiológicas	50
2.3 Análises microbiológicas da polpa de pequi <i>in natura</i> , polpa recém retirada e polpa armazenada após o branqueamento	52
2.4 Análises microbiológicas de amostras coletadas das mãos dos manipuladores e nas superfícies de manipulação	52
2.5 Análises microbiológicas do ambiente e da água utilizada no processamento	52
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4 CONCLUSÕES	57
CAPÍTULO III - ADAPTAÇÃO ÁCIDA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONSERVAS DE POLPA DE PEQUI	58
RESUMO	58
ABSTRACT	58
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 Amostras	61
2.2 Microorganismos	61
2.3 Avaliação de adaptação ácida	61
2.4 Análise estatística	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4 CONCLUSÕES	67

CAPÍTULO IV - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS EM POLPA DE PEQUI (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.) COM POTENCIAL PARA ATUAREM COMO AGENTES DE BIOCONSERVAÇÃO	68
RESUMO	68
ABSTRACT	68
1 INTRODUÇÃO	69
2 MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Amostras	70
2.2 Isolamento e identificação de bactérias lácticas e leveduras	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4 CONCLUSÕES	75
CONCLUSÕES INTEGRADAS	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICE I - ARTIGO ORIGINAL PUBLICADO NO PERIÓDICO “<i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i>”	109

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- I.1 Contagens de aeróbios mesofílicos e de bolores e leveduras em três marcas comerciais de conservas de polpa de pequi 41
- I.2 Incidência de *Salmonella* spp. em três marcas comerciais de conservas de polpa de pequi 42
- I.3 Comparação das contagens de mesófilos aeróbios em agar tryptic soy (TSA) antes e após o enriquecimento em caldo tryptic soy (TSB) nas diferentes marcas de conservas de polpa de pequi 43

CAPÍTULO II

- II.1 Análise microbiológica das amostras de polpa de pequi *in natura*, polpa recém retirada e polpa armazenada após o branqueamento ... 53
- II.2 Análise microbiológica das amostras coletadas das mãos dos manipuladores 54
- II.3 Análise microbiológica de amostras das superfícies de manipulação, do ambiente e da água utilizada no processamento ... 55

CAPÍTULO IV

- IV.1 Identificação de dez isolados de bactérias lácticas de polpa de pequi *in natura* através do sistema API 50 CHL 72
- IV.2 Comparação da identificação de dez isolados de leveduras de polpa de pequi *in natura* pelos sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC 74

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- I.1 Recuperação de bactérias coliformes de diferentes marcas de conservas de polpa de pequi com ágar VRB antes e após o enriquecimento em caldo TSB 44
- I.2 Recuperação de enterobactérias de diferentes marcas de conservas de polpa de pequi com ágar McConkey antes e após o enriquecimento em caldo TSB 45

CAPÍTULO III

- III.1 Adaptação ácida de *Salmonella typhimurium* em conservas de polpa de pequi 64
- III.2 Adaptação ácida de *Escherichia coli* em conservas de polpa de pequi 65

CAPÍTULO IV

- IV.1 Perfil de identificação de leveduras pelo sistema API 20 C AUX 73

RESUMO

A qualidade microbiológica de conservas de polpa de pequi comercializadas na região norte do estado de Minas Gerais foi avaliada. Análises microbiológicas realizadas em três marcas demonstraram que esse produto pode apresentar risco aos consumidores devido à presença de *Salmonella* spp. Baixos níveis de contaminação por enterobactérias foram observados, porém, a presença de células injuriadas foi verificada. As condições higiênico-sanitárias de uma indústria processadora de conservas localizada na mesma região também foram investigadas, demonstrando-se que estas eram inadequadas. Foi detectada a presença de bactérias patogênicas nas mãos dos manipuladores e na matéria-prima, além de bactérias coliformes na água usada pela indústria. Foi observado que a matéria-prima era armazenada em condições de pH mediano (5,2-5,8). Assim, avaliou-se a adaptação ácida de enterobactérias inoculadas nas conservas, demonstrando-se maior recuperação das células pré-adaptadas quando comparadas às células não adaptadas. O isolamento e identificação de leveduras e bactérias lácticas em polpa de pequi foram realizados visando propor futuros estudos sobre a utilização desses microrganismos como agentes de biocontrole. Foram isoladas e identificadas bactérias do gênero *Lactobacillus* e leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

Palavras-chave: biocontrole; *Caryocar brasiliense*; conservas de pequi; qualidade microbiológica.

ABSTRACT

The microbiological quality of pequi pulp preserves marketed in the north area of the state of Minas Gerais it was evaluated. Microbiological analyzes accomplished in three brands demonstrated that the product can represent risk to the consumers due to the presence of *Salmonella* spp. Low levels of contamination by enterobacteria were observed; however, the presence of injured cells was verified. The hygienic and sanitary conditions of a processing industry of pequi pulp preserve located in the same area were also investigated and were demonstrated to be were inadequate. The presence of pathogenic bacteria was detected on the handlers and in the raw material, and also coliform bacteria were shown in the water used by the industry. It was observed that the raw material was stored in conditions of medium pH (5,2-5,8). Then, the acid adaptation of enterobacteria inoculated in the preserves was evaluated, being demonstrated better recovery of the pre-adapted cells when compared to the non-adapted cells. The isolation and identification of yeasts and lactic bacteria in the pequi pulp were accomplished to propose the use of those microorganisms as biocontrol agents. *Lactobacillus* and yeasts of the genus *Candida* and *Cryptococcus* were isolated and identified.

Keywords: biocontrol; *Caryocar brasiliense*; pequi pulp preserves; microbiological quality.

INTRODUÇÃO

Produto do extrativismo, o fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), o pequi, é importante para alimentação e renda de diversas comunidades da região norte do estado de Minas Gerais, constituindo-se em fonte de energia, proteínas, vitaminas e sais minerais (ALMEIDA, 1998; LIMA, 1980). Além da forma extrativista, o pequi é explorado para subsistência e para indústrias locais de derivados (POZO, 1997). Entretanto, o potencial econômico desta espécie ainda é pouco conhecido (ARAÚJO, 1995).

Em Minas Gerais observa-se um crescente aumento da produção, industrialização e comercialização do pequi e seus derivados, incentivadas por iniciativas como a Lei do “Pró-Pequi” (MINAS GERAIS, 2002) e a organização de cooperativas e associações, voltadas para a preservação e o aproveitamento de frutos do cerrado. O uso diversificado e a qualidade nutricional do pequi têm elevado o interesse pelo produto atualmente, refletindo em aumento no volume do fruto comercializado nos últimos anos (CEASAMINAS, 2006).

Em função da produção sazonal, o aproveitamento alimentar e econômico do pequi fica restrito a alguns meses durante o ano. A rápida deterioração e o alto custo de conservação por métodos convencionais, como o congelamento, limita o armazenamento do produto durante os períodos de entressafra. A conserva de pequi, devido ao menor custo de conservação em relação ao congelamento, tem sido usada tradicionalmente pela população e pelas indústrias como a principal forma de conservação do pequi.

A industrialização de conservas de pequi na região tem expandido anualmente e muitas indústrias são implantadas sem suporte técnico adequado, o que tem originado produtos de segurança microbiológica desconhecida. A não observação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e condições higiênicas inadequadas durante o processamento das conservas podem propiciar riscos aos consumidores e a perda de confiabilidade do produto.

A segurança microbiológica das conservas depende da microbiota presente no fruto *in natura* e da contaminação em cada etapa do processamento. Assim como a manipulação, a sanitização inadequada de superfícies, equipamentos e utensílios contribui para o aumento das populações microbianas nas conservas, ampliando o risco da presença de microrganismos patogênicos. A vida de prateleira e a segurança

do produto dependerão do controle da contaminação durante o processamento (SIQUEIRA et al., 1997).

A falta de registros sobre a qualidade microbiológica de conservas de polpa de pequi comercializadas na região norte do estado de Minas Gerais justifica a necessidade de avaliação da segurança desse produto. Além disso, a avaliação das condições higiênico-sanitárias durante o processamento se faz necessária para garantia de segurança das conservas de pequi. Os resultados desta análise de qualidade microbiológica poderão ser utilizados para implementar práticas mais eficientes no processamento da polpa de pequi e também serem úteis para avaliação de risco do produto. Para tal é importante determinar os pontos de contaminação durante o processamento das conservas, propondo ações preventivas.

Nas indústrias de processamento de frutas os principais pontos de contaminação microbiana são: o ar das áreas de processamento, a água usada na indústria, as superfícies de contato com o alimento e as condições higiênico-sanitárias da manipulação (TORREZAN et al., 2000). Durante o processamento de conservas de pequi, o armazenamento da matéria-prima em condições inadequadas é outro ponto crítico de contaminação, podendo promover a adaptação de microrganismos a condições de estresse, afetando a segurança do produto final.

Uma pequena redução da acidez em condições inadequadas de armazenamento pode induzir adaptação de microrganismos à acidez mais acentuada, além de conferir proteção cruzada contra outros obstáculos impostos ao crescimento microbiano durante o processamento das conservas, como diminuição da atividade de água, adição de conservantes e tratamento térmico. Microrganismos como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* já demonstraram capacidade de adaptação a condições de acidez mediana, sobrevivendo posteriormente à exposição em acidez mais extrema e a outros fatores de estresse (GOODSON & ROWBURY, 1989; FOSTER, 1993; FOSTER, 2001).

A bioconservação pode ser uma alternativa viável para aumentar a segurança do produto, além de contribuir para diminuir as perdas de produção e os gastos no processamento do pequi. Os agentes bioconservadores podem ser obtidos a partir da matéria-prima *in natura*. Entre os grupos de microrganismos que podem ser empregados na bioconservação do pequi estão incluídos bactérias lácticas e leveduras, que já demonstraram potencial na bioconservação de alimentos (FRAVEL, 2005; BERNBOM et al. 2006; YU & ZHENG, 2007).

Foram abordados nesta tese aspectos referentes ao produto pequi, com ênfase na avaliação da segurança microbiológica das conservas de polpa comercializadas na região norte do estado de Minas Gerais. Avaliaram-se os riscos que o produto representa para os consumidores e as condições higiênico-sanitárias durante seu processamento. Aspectos relacionados à injúria e à adaptação ácida microbiana nas conservas também foram abordados, além do isolamento e identificação de potenciais agentes de biocontrole.

OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste trabalho foram avaliar a qualidade microbiológica de conservas de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) comercializadas na região norte do estado de Minas Gerais e identificar agentes potenciais de bioconservação para o produto.

Os objetivos específicos foram:

- realizar análises microbiológicas em amostras comerciais de conservas de polpa de pequi obtidas na região norte do estado de Minas Gerais;
- verificar a possibilidade de injúria microbiana nas amostras analisadas;
- determinar os principais pontos de contaminação durante o processamento das conservas de polpa de pequi;
- avaliar a possibilidade de adaptação de microrganismos ao estresse ácido na matéria-prima armazenada antes do processamento final das conservas;
- isolar e identificar bactérias lácticas e levedura de amostras de polpa de pequi *in natura*;

REVISÃO DA LITERATURA

1 O pequi

Pequi, piqui, pequizeiro, piquizeiro, piquirana, piqui-banana, piquiá-bravo, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, pequiá, pequiá-pedra, pequerium, súari, pequido-cerrado ou pequiá-ête são denominações comuns de plantas da espécie *Caryocar brasiliense* Cambess e outras do mesmo gênero como *C. coriaceum* Witmm, *C. barbinerve* e *C. crenatum* (LORENZI, 1992).

O pequizeiro é uma espécie típica da região do Cerrado (ARAÚJO, 1995; VERA et al., 2007), em especial, ocorre em grande abundância na Região Norte do estado de Minas Gerais. No Brasil, é grande a área de incidência do pequizeiro, estendendo-se do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Goiás, Bahia, Ceará e até São Paulo e Minas Gerais. A espécie mais freqüente no estado de Minas Gerais é a *Caryocar brasiliense* Camb. (PEIXOTO, 1973). A Lei nº 10.883 (MINAS GERAIS, 1992) declara de preservação permanente, de interesse comum e imune de corte, no estado de Minas Gerais, o pequizeiro (*Caryocar brasiliense*).

O peso médio do fruto do pequizeiro é de cerca de 120 g, sendo que a casca representa 82% do fruto, o endocarpo 4,6%, a polpa 7% e a amêndoa 1% (ALMEIDA & SILVA, 1994). Entretanto, MIRANDA & OLIVEIRA FILHO (1990) afirmaram que o peso unitário do fruto varia de 50 g a 250 g, a casca de 20 g a 117 g, a amêndoa de 2 g a 4 g, com valor médio de 8,14 g de polpa. Em estudos no estado de Goiás, a massa do fruto variou de 18,80 g a 399,39 g, sendo 8,53% da massa dos frutos representando a polpa fresca comestível (VERA et al. 2005; VERA et al., 2007). TEIXEIRA et al. (2004) demonstraram que o pequi oriundo dos municípios de Japonvar e Campo Azul, estado de Minas Gerais, apresenta uma relação de 0,72 entre a massa média da casca e do fruto inteiro. Outros autores demonstraram uma variação de 2,45 g a 16,10 g na massa total das polpas por fruto (SOUZA, 2005; VERA et al., 2005; VERA et al., 2007). A massa total de polpa é uma característica física de grande importância econômica, pois é a parte do pequi mais consumida na alimentação humana e, por esse motivo, desperta maior interesse comercial (VERA et al., 2007).

FRANCO (1982) e GODOY (1993) analisando a composição química da polpa de pequi encontraram elevado teor de provitamina A, divergindo dos resultados obtidos por RAMOS et al. (2001) que afirmaram que o total de provitamina A encontrada na polpa mostrou-se muito inferior ao citado na literatura, sendo provável que este valor superestimado tenha sido obtido com base no total de carotenóides e não apenas dos pigmentos precursores de vitamina A. MELEIRO & AMAYA (2004) confirmaram por HPLC-DAD e HPLC-MS que são pequenas as quantidades de β -criptoxantina, β -caroteno e neoxantina.

ALMEIDA (1998) afirmou que a polpa de pequi apresenta 19,66% de carboidratos totais, 11,6% de fibras, teor lipídico de 20,21% e teor protéico de 2,64%. FERREIRA (1987) determinou para polpa teores de 61,79% de lipídios e teores de proteína de 6,71%. VILELA (1998) encontrou valores entre 20,60% e 26,20% para o teor lipídico e entre 4,0% e 6,0% para proteína em pequi dos municípios de Montes Claros e Brasilândia, estado de Minas Gerais. Os resultados obtidos por OLIVEIRA et al. (2006) no município de Montes Claros indicaram que os teores de lipídios, proteínas e carotenóides do pequi aumentaram com o avanço do estágio de maturação dos frutos.

Segundo HANDRO & BARRADAS (1971), o óleo da polpa apresenta componentes saturados de baixo número de carbono, ao contrário do óleo da amêndoa do pequi, que contém quantidade maior de ácido linoléico, portanto, maior teor em ácidos insaturados. ARAÚJO (1995) demonstrou que os ácidos graxos presentes em maior teor na polpa do pequi foram o ácido palmítico (39%) e oléico (54%). Dois estudos no estado de Goiás determinaram o valor do pH da polpa de pequi, com média que variou de 5,79 a 6,97 (VERA et al., 2005; VERA et al., 2007). ROESLER et al. (2007) afirmaram que o pequi possui grande potencial antioxidante, podendo representar uma aplicação sustentável dos recursos do cerrado nos setores farmacêuticos, cosméticos e nutricionais.

Historicamente, segundo LIMA (1980), o pequi tem sido uma fonte nutricional muito importante para as populações nativas do norte de Minas Gerais, e o aumento do consumo de pequi pela população teria como principal finalidade suprir as necessidades nutricionais, especialmente nas populações rurais e de baixa renda. O pequi pode ser consumido com arroz, feijão, galinha ou sua polpa pode ser batida com leite e açúcar (ALMEIDA & SILVA, 1994). Deste fruto também se extrai um óleo utilizado no preparo de pratos típicos regionais (ALMEIDA & SILVA, 1994). As pessoas

que sobreviviam da coleta do fruto do pequi, estão comercializando o produto *in natura* e também na forma de produtos derivados como farinha, doce, temperos, óleo, licor, conservas entre outros (RIBEIRO et al., 1994).

O processamento agroindustrial do pequi, dependendo do produto, não exige muita sofisticação de equipamentos e instalações. Por intermédio de iniciativas individuais ou do cooperativismo, agroindústrias para o processamento do pequi podem ser instaladas para a produção de conservas, óleo, polpa seca, pequi congelado, chás, licor, sabão, tinturas, dentre outras. Tal iniciativa pode ser altamente econômica, sem necessariamente envolver grande aporte de recursos para instalações de processamento (ALMEIDA et al., 1987).

2 Resposta dos microrganismos ao estresse no processamento de alimentos

Embora seja possível controlar e transformar muitos processos na natureza é improvável que se tenha o controle completo sobre o reino microbiano (BOWER & DAESCHEL, 1999). As bactérias presentes nos sistemas alimentares estão frequentemente sujeitas ao estresse imposto propositalmente durante o processamento como barreira para seu crescimento (ARCHER, 1996). Alguns microrganismos evoluíram e adquiriram a capacidade de rapidamente se adaptarem às mudanças contínuas no ambiente, desenvolvendo tolerância ou resistência ao aumento de um estresse particular. Tipos diferentes de organismos possuem resistência e susceptibilidade diferente ao estresse (BEALES, 2004). As tecnologias de preservação dos alimentos podem injuriar ou estressar mais os microrganismos do que matar, constituindo um risco potencial durante o processamento (LADO & YOUSEF, 2002). As células adaptadas ao estresse são um desafio para a indústria de alimentos, uma vez que podem sobreviver a processos que combinam vários fatores de preservação. Adicionalmente, a exposição repetida dos contaminantes bacterianos ao processo de preservação pode selecionar mutantes altamente resistentes (LADO & YOUSEF, 2002).

As reações de estresse dos microrganismos podem ser uma limitação ao sucesso na aplicação da tecnologia dos obstáculos (LEISTNER & GORRIS, 1995), uma vez que a exposição de uma célula a múltiplos estresses pode amplificar o sistema de resposta ao estresse (BEALES, 2004). *Escherichia coli*, por exemplo, pode usar o NaCl para enfrentar a acidificação provocada por ácidos orgânicos (GARREN et

al., 1998; CASEY & CODON, 2002). Portanto, a combinação dos efeitos preservativos nem sempre alcançam um efeito aditivo na inibição de microrganismos no alimento se as respostas ao estresse foram acionadas e permitirem o crescimento do microrganismo (BEALES, 2004). O uso de múltiplas barreiras ao crescimento bacteriano está afetando a fisiologia das bactérias presentes nos alimentos, incluindo as bactérias patogênicas, cujos objetivos são simples: sobreviver e multiplicar (ARCHER, 1996). CHUNG et al. (2006) afirmaram que é preciso evitar que a tecnologia dos obstáculos promova a proteção cruzada entre os vários estresses aplicados e aumente a virulência dos patógenos alimentares, minimizando os riscos de doenças de origem alimentar.

O estresse ambiental pode modular a virulência bacteriana (ARCHER, 1996). GAHAN e HILL (1999) confirmaram a associação entre resposta ao estresse e aumento de virulência em patógenos entéricos. Patógenos adaptados ao estresse quando expostos por tempo prolongado ao mesmo estresse ou estresse diferente podem gerar mutações adaptativas, levando ao surgimento de novos genótipos (CHUNG et al., 2006). Essas mutações são capazes de se multiplicar sob condições adversas com ampliação da virulência (ARCHER, 1996). As células bacterianas podem se adaptar a condições de crescimento normalmente desfavoráveis após uma breve exposição a um estresse mediano (GAHAN & HILL, 1999). Bactérias patogênicas podem sobreviver até o momento em que as condições ambientais mudem e favoreçam o crescimento. O alimento contaminado pode ser usado como ingrediente para a fabricação de outros alimentos, ser empregado na preparação de uma refeição ou ter seu pH aumentado, devido ao crescimento de outros microrganismos (HILL et al., 1995).

Durante o seu ciclo de vida, bactérias como *Salmonella* podem encontrar várias condições de estresse ambiental como estresse ácido, oxidativo, osmótico e térmico (FOSTER & SPECTOR, 1995), que podem afetar sua sobrevivência e virulência (ARCHER, 1996). *Salmonella* é capaz de perceber condições de estresse como sinais para induzir drásticas mudanças na expressão gênica e na síntese de proteínas (FOSTER & SPECTOR, 1995). A função principal da resposta ao estresse é capacitar as células a serem mais tolerantes ou resistentes às condições de estresses encontradas (KWON & RICKE, 1998).

Tanto as estirpes patogênicas quanto não patogênicas de *E. coli* exibem respostas ao estresse ambiental (RYU & BEUCHAT, 1998; LEENANON & DRAKE, 2001; CHUNG et al., 2006). Vários autores têm demonstrado a tolerância ao estresse e sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em alimentos (ABDUL-RAOUF et al., 1993; ZHAO et al., 1993; MILLER & KASPAR, 1994). Estas respostas podem resultar na resistência a uma variedade de parâmetros ambientais ou de processamento (LIN et al., 1996; ABEE & WOUTERS, 1999). A resposta ao estresse nas estirpes patogênicas de *E. coli* variam extensamente (BENJAMIN & DATTA, 1995; LEENANON & DRAKE, 2001).

A resistência de patógenos entéricos como *Salmonella* e *Escherichia coli* ao estresse ambiental é importante para a segurança alimentar. Nestes microrganismos, a expressão de vários genes de resistência sob o controle de um fator sigma RpoS é responsável pela resistência ao estresse (DODD et al., 2007). O RpoS controla a expressão de um conjunto específico de cerca de 40 operons gênicos envolvidos na produção de mudanças associadas com o estresse ambiental, afetando a segurança dos alimentos (DODD & ALDSWORTH, 2002). Este fator induz resposta a vários processos existentes no processamento de alimentos, incluindo aquecimento (HENGGE-ARONIS et al., 1991; MCCANN et al., 1991), pH (LEE et al., 1995) e estresse osmótico (MCCANN et al., 1991). As implicações para o processamento de alimentos é que um estresse sub-letal pode produzir pré-adaptação a uma série de outros estresses pela indução de RpoS e aumento da sobrevivência em estágios posteriores do processamento. Conseqüentemente, esta pré-adaptação pode aumentar a virulência potencial de células que sobrevivam ao processamento. O papel do RpoS e suas implicações na segurança alimentar tem sido demonstrado por diversos autores (BEARSON et al., 1997; WATERMAN & SMALL, 1998; MATTICK et al., 2000; BEALES, 2004; CHUNG et al., 2006; YUK & SCHNEIDER, 2006; DODD et al., 2007).

2.1 Tratamento térmico

O aquecimento de culturas bacterianas elimina algumas células da população e pode injuriar outras (McCLEERY & ROWE, 1995; DOYLE & MAZZOTTA, 2000; ALJARALLAH & ADAMS, 2007). Dependendo de como as células são tratadas após o aquecimento, estas podem sobreviver e serem contadas ou podem morrer (DOYLE & MAZZOTTA, 2000). As variações nos procedimentos para a recuperação e contagem de células tratadas termicamente podem originar estimativas diferentes de tolerância

térmica. Existe geralmente uma fase lag de várias horas a vários dias antes que as células danificadas termicamente iniciem um crescimento mensurável (DOYLE & MAZZOTTA, 2000). Para STEPHENS et al. (1997), a incubação em meio rico, mais do que em meio seletivo, amplia a recuperação de células injuriadas. DOYLE e MAZZOTTA (2000) afirmaram que, entre o melhor e o pior meio para recuperação, pode existir uma diferença de até três ciclos logaritmos no número de células recuperadas. GEORGE et al. (1998) demonstraram que a incubação de células injuriadas sob condições anaeróbicas pode aumentar a sobrevivência.

Células que crescem em altas temperaturas ou são expostas a um choque térmico não letal são mais termo resistentes (XAVIER & INGHAM, 1997). O aumento de sólidos e a diminuição do pH nos alimentos também podem aumentar a resistência térmica. Em condições de pH mais alto, ocorre uma maior destruição térmica de *Salmonella*, enquanto que em condições mais ácidas amplia-se a resistência (BLACKBURN et al., 1997). A diminuição da atividade de água provocada por altas concentrações de sal também aumenta a resistência térmica (BLACKBURN et al., 1997; FLETCHER & CSONKA, 1998).

A inativação térmica de patógenos tem sido extensivamente avaliada, produzindo como resultado uma extensa faixa de valores D e Z. Entretanto, estimar a taxa de inativação para uma determinada condição específica baseado nos valores publicados é uma questão complexa, uma vez que é necessário selecionar as condições representativas, sendo que os dados exatos para estas condições geralmente não estão disponíveis. Além disso, o estado fisiológico das bactérias e a presença de estirpes contaminantes específicas não são conhecidos (ASSELT & ZWIETERING, 2006).

Várias condições de tratamento térmico utilizadas pelas indústrias processadoras de alimentos e o cozimento de alimentos em casa geralmente são efetivos na destruição de células vegetativas de bactérias patogênicas de origem alimentar. Porém, ocasionalmente existem microrganismos que sobrevivem às técnicas de processamento térmico de alimentos. Este fato pode ser o resultado de mudanças na formulação dos alimentos e alterações na composição de sólidos, acidez e atividade de água que afetam a termotolerância (DOYLE & MAZZOTTA, 2000).

O crescimento prévio e as condições de estocagem podem alterar a resistência de qualquer microrganismo. A temperatura máxima para o crescimento, assim como a temperatura na qual *Salmonella* iniciam a fase de morte depende da estirpe presente, sua fase de crescimento, da composição do alimento e da presença de microrganismos competidores (DOYLE & MAZZOTTA, 2000). Bactérias do gênero *Salmonella* certamente são sensíveis ao calor, mas essa sensibilidade pode ser muito variável. *Salmonella* em alimentos mantidos a temperatura ambiente por um período determinado são mais resistentes ao calor do que aquelas que sobrevivem em temperatura de refrigeração. Esse fato é a razão principal para se ter precaução com o abuso de temperatura dos alimentos ou seus ingredientes (DOYLE & MAZZOTTA, 2000). Os valores de resistência térmica para *Salmonella* publicados na literatura podem variar extensamente (MAÑAS et al., 2001; MAÑAS & PAGAN, 2005).

A presença de outros microrganismos tem efeito protetor na destruição térmica de *Salmonella* (DOYLE & MAZZOTTA, 2000). DUFFY et al. (1995) sugeriram que a presença de competidores é interpretada pelas células de *Salmonella* como um sinal para induzir a expressão gênica, durante a fase estacionária, que leva a um aumento da resistência térmica, sendo essa proteção o resultado da rápida diminuição do oxigênio dissolvido que reduz o dano oxidativo.

2.2 Acidez

Resistência ácida, tolerância ácida e habituação ácida são termos usados para descrever a sobrevivência ao estresse por baixo pH em diferentes condições. É difícil determinar, a partir da literatura, se os sistemas citados são verdadeiramente diferentes ou simplesmente refletem maneiras diferentes de medir o mesmo sistema (BEARSON et al., 1997). A resposta de tolerância ácida é um fenômeno pelo qual as bactérias que são expostas a condições de acidez mediana adquirem a habilidade de sobreviver em valores de pH normalmente letais. Esse fenômeno adaptativo pode ter conseqüências importantes para a sobrevivência de bactérias deterioradoras e patogênicas nos alimentos ácidos. A maioria das bactérias tem a capacidade de resistir a pequenas mudanças em um parâmetro ambiental e podem se adaptar em minutos, horas ou dias. Grandes variações a partir dos valores ótimos podem causar a indução de respostas ao estresse mais elaboradas (HILL et al., 1995).

Os microrganismos entéricos preferem crescer em ambientes com pH neutro, mas durante a patogênese, estes experimentam flutuações drásticas do pH. Em resposta aos ambientes ácidos, esses organismos evoluíram estratégias induzidas e complexas de sobrevivência (BEARSON et al., 1997). Além disso, para muitos microrganismos uma exposição a baixo pH, baixa atividade de água ou alta temperatura pode conduzir a um aumento da tolerância ácida com grande adaptação metabólica pelas células ao ambiente ácido (MARECHAL et al., 1999). LIN et al., (1996) demonstram que os sistemas de resistência ácida, uma vez induzidos, permanecem ativos por longos períodos. Esses autores esclareceram que uma propriedade importante dos patógenos microbianos, associada às rotas oral-fecal de transmissão, é sua habilidade de sobreviver em ambientes extremamente ácidos, assim como em ambientes moderadamente ácidos contendo ácidos orgânicos. A resistência ao pH baixo pode ser importante para os patógenos de origem alimentar sobreviverem em alimentos específicos e no trato gastrintestinal. Uma vez que o baixo pH do estômago é um importante mecanismo de defesa, a habilidade em tolerar o baixo pH pode ter implicações para a virulência de patógenos alimentares invasivos (HILL et al., 1995).

Muitas bactérias patogênicas de origem alimentar exibem respostas a estresse que ampliam sua sobrevivência em condições ambientais adversas. Um estresse comum em alimentos é o ambiente ácido, no qual o aumento da sobrevivência pode envolver a indução de uma resposta de tolerância ácida (GREENACRE et al., 2003). A complexidade da resposta ao estresse ácido, diferentes condições experimentais e diferenças nas estirpes bacterianas produzem resultados variáveis (CHUNG et al., 2006). BOOTH et al. (2002) revisaram as questões relacionadas à adaptação às condições ácidas, em particular os mecanismos que podem ser empregados pelas bactérias para responder a este estresse específico. Fatores como temperatura e pH afetam a sensibilidade ácida das enterobactérias (ROWBURY, 1995). LEE et al. (1994) mostraram que os microrganismos podem se adaptar ativamente para sobreviver a exposições potencialmente letais de acidez. A resistência ácida induzida pela acidez pode reduzir a eficiência da tecnologia dos obstáculos (ABEE & WOUTERS, 1999). WATERMAN e SMALL (1998) declararam que patógenos entéricos sensíveis à acidez podem se adaptar e proteger suas células em condições ácidas extremas como pH 2,5. A habilidade em resistir à alta acidez pode permitir aos microrganismos patogênicos

sobreviverem nos alimentos ácidos, até o momento de serem consumidos (CONNER & KOTROLA, 1995; LEYER et al., 1995).

CHUNG et al. (2006) fizeram uma revisão sobre a regulação do estresse e a resposta de tolerância ao estresse ácido e térmico de *E. coli*. LIN et al. (1995) e LIN et al. (1996) detalharam os mecanismos de resposta ácida em *E. coli* que permitem sua sobrevivência em valores de pH de 2,0 a 2,5. ARNOLD e KASPAR (1995) e LEYER et al. (1995) demonstraram o mesmo mecanismo em estirpes de *E. coli* sorotipo O157:H7. A sobrevivência de *E. coli* em alimentos de baixo pH ($\leq 4,5$) como maionese (RAGHUBEER et al., 1995), cidra de maçã (ZHAO et al., 1993) e derivados de leite fermentado (AROCHA et al., 1992) já foi verificada. *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 podem sobreviver em suco de cidra de maçã cujo pH está entre 3,3 e 4,1 sendo que qualquer bactéria patogênica que sobreviva a estas condições pode sobreviver ao pH do estômago e causar doença (ZHAO et al., 1993; MILLER & KASPAR, 1994).

A tolerância ácida pode ser uma propriedade constitutiva de uma estirpe bacteriana ou um fenômeno induzido como resposta fenotípica da bactéria, associada com uma exposição à acidez mediana (BROWN et al., 1997). O mecanismo de tolerância ácida pode ser induzido pela pré-exposição das bactérias às condições de acidez (BRACKETT et al., 1994). Durante a exposição a condições ácidas medianas, as bactérias adquirem a habilidade para sobreviver em concentrações ácidas letais (BEALES, 2004). BEARSON et al. (1997) afirmaram que células crescendo ativamente em pH inicial 7,7 rapidamente morrem quando submetidas a condições de pH abaixo de 4,0. Porém, adaptando essas células a condições ácidas medianas (pH 5,8) por uma geração, ocorre um aumento da tolerância à acidez mais extrema, como pH 3,0 (FOSTER & HALL, 1990).

Em suco de frutas, YUK e SCHNEIDER (2006) confirmaram que as condições ácidas moderadas podem tornar as salmonelas mais resistentes ao suco gástrico, aumentando o risco de doenças. LEYER e JOHNSON (1992) mostram que *Salmonella* induzida pela acidez foi capaz de prolongar sua sobrevivência em queijo, quando comparado com *Salmonella* não induzida. Os mesmos autores também demonstraram que estirpes de *Salmonella* adaptadas podem sobreviver melhor durante a fermentação de derivados de leite do que estirpes não adaptadas.

Um importante fator de adaptação de *Salmonella typhimurium* é a resposta de tolerância ácida, na qual a resistência do microrganismo é ampliada quando as células são expostas a condições consideradas medianamente ácidas como pH 5,8 (FOSTER, 1995). Esta adaptação de *S. typhimurium* parece ter papel importante na sobrevivência a várias condições de estresse. *Salmonella typhimurium* desenvolve respostas de combate a estresses ambientais tais como extremos de pH e concentração de sal (FOSTER & SPECTOR, 1995). A resposta de tolerância ácida em *Salmonella* é induzida como proteção contra estresse causado por acidez severa (GREENACRE & BROCKLEHURST, 2006). WILMES-RIESENBERG et al. (1996) submeteram culturas de *S. typhimurium* pré-adaptadas a pH 5,8 a uma exposição em pH 3,3, verificando que as culturas adaptadas resistiram mais à acidez que as não adaptadas. Esses autores analisaram o papel da resposta de tolerância ácida na patogênese de *S. typhimurium*, demonstrando que para sobreviver em ambientes ácidos este microrganismo necessita de uma resposta adaptativa de tolerância ácida induzida sob condições de acidez mediana. Células adaptadas à acidez mantêm o pH interno numa faixa de 0,4 a 0,9 unidades de pH abaixo daquele das células não adaptadas (FOSTER, 1991; FOSTER & HALL, 1991).

LEYER et al. (1995) determinaram que células de *E. coli* O157:H7 adaptadas a acidez sobrevivem melhor do que células não adaptadas durante a fermentação de lingüiça, exibindo também maior sobrevivência em salame desidratado e cidra de maçã. GOODSON e ROWBURY (1989) demonstraram que células de *E. coli* habituadas em pH 5,0 sobrevivem melhor à mudança para pH 3,5 ou 3,0 do que células que cresceram inicialmente em pH 7,0. Estes autores argumentaram que para o controle da tolerância ácida de microrganismos nos alimentos é necessário evitar que os microrganismos se tornem adaptados à acidez. Para tanto, é sugerido que o processo de acidificação seja realizado rapidamente, evitando que os microrganismos se adaptem a redução gradual do pH e não sejam afetados pelo pH final do produto e sobrevivam por longo tempo nos alimentos ácidos.

Os ácidos fracos são uma freqüente ameaça à sobrevivência bacteriana em alguns alimentos e no trato gastrintestinal. LIN et al. (1996) consideram que os mecanismos de resistência ácida efetivos contra pH extremamente ácido podem ajudar a combater os efeitos deletérios dos ácidos orgânicos. HILL et al. (1995) discutiram a habilidade de microrganismos patogênicos de se adaptarem e tolerarem baixo pH, destacando a importância deste fato para os processadores de alimentos, uma vez que

os ácidos orgânicos são usados nos alimentos para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis. O estresse ácido pode ser descrito como o efeito biológico combinado de baixo pH e ácidos orgânicos presentes no ambiente (BEARSON et al., 1997). A adição de conservantes ácidos orgânicos, como benzoatos, pode induzir resposta de tolerância ácida, necessária para a adaptação de bactérias em pH baixo (KWON & RICKE, 1998; BEALES, 2004). Existem ácidos orgânicos que ocorrem naturalmente em muitas frutas e vegetais e que são usados para manter a estabilidade microbiana em alimentos com baixo pH, incluindo sucos de frutas e vegetais em conserva (RESTAINO et al., 1982). Quando expostos a concentrações medianas de ácidos orgânicos usados como conservantes, os microrganismos podem se adaptar ao estresse, desenvolvendo tolerância ou resistência ao aumento do estresse provocado por esses ácidos (WARTH, 1988; GOODSON & ROWBURY 1989). FLEET (1992) verificou que alguns microrganismos resistentes a conservantes como benzoato também resistem a outros como sorbato e acetato.

As concentrações inibitórias mínimas de ácidos orgânicos para inativar vários microrganismos pode variar consideravelmente (BEALES, 2004). Em geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes aos ácidos orgânicos usados como conservantes do que as bactérias Gram-positivas (RUSSELL, 1991). Bactérias como *S. typhimurium* e *E. coli* podem sobreviver a situações potencialmente letais como a presença de ácidos orgânicos (GOODSON & ROWBURY 1989; BAIK et al., 1996). LEYER e JOHNSON (1992) mostraram que a adaptação ácida aumenta a resistência de *Salmonella* spp. a vários ácidos orgânicos. GOODSON e ROWBURY (1989) demonstraram que a resistência ácida de *E. coli* O157:H7 é ativado por ácidos orgânicos e pelo baixo pH. GUILFOYLE e HIRSHFIELD (1996) também observaram que ácidos orgânicos podem induzir resistência ácida em *E. coli*, informação confirmada por BEARSON et al. (1997), que observaram o comportamento de *E. coli* em pH 3,5 após adaptação em pH 6,5 com e sem ácidos orgânicos, concluindo ser a sobrevivência do microrganismo de 50 a 200 vezes maior na presença de ácidos orgânicos.

2.3 Mecanismos de resistência ácida de microrganismos

Para aumentar as chances de sobrevivência a diversas situações de estresse, as bactérias produzem uma resposta molecular programada, pela qual proteínas específicas são sintetizadas, induzidas pelo estresse. Estas proteínas atuam prevenindo ou reparando danos moleculares causados pelo estresse. Enquanto algumas proteínas são induzidas sob muitas condições diferentes de estresse, por exemplo, proteínas de estresse universal, outras são sintetizadas somente em resposta a um estresse específico. A habilidade de sentir e responder a mudanças potencialmente letais no pH ambiental é crucial para a sobrevivência das enterobactérias (BEARSON et al., 1997; BEALES, 2004).

Salmonella Typhimurium possui diferentes sistemas de sobrevivência ácida induzidos pela redução do pH, dependendo se a célula está em fase exponencial ou estacionária. A resposta de tolerância ácida deste microrganismo é um processo em dois estágios, envolvendo sistemas de adaptação ácida ativados em diferentes níveis de acidez. Em pH 6 é ativado o primeiro estágio (choque pré-ácido), envolvendo a síntese de sistemas de homeostase do pH que alcalinizam o pH durante os períodos de estresse ácido extremo (pH 3). O segundo estágio (choque pós-ácido) é ativado quando o pH diminui para valores abaixo de 4,5. Aproximadamente 50 proteínas do choque ácido são necessárias para evitar ou reparar os danos moleculares neste estágio (BEARSON et al., 1997).

BEALES (2004) identifica em *Salmonella* spp. três estágios de homeostase do pH. Em valores de pH tão altos quanto 6, as bombas de prótons são reguladas. Quando as células estão crescendo exponencialmente (em pH 7,6) e são mudadas para condições ácidas medianas (pH 5,5 a 6,0), é disparada uma resposta de tolerância ácida (FOSTER & HALL, 1990). Esta adaptação é referida como pré-choque e envolve a indução de 12 proteínas e a repressão de 6 proteínas. O prolongamento do tempo de permanência nesta faixa de pH permite as células crescerem em valores de pH tão baixos quanto 4. Um pH entre 3 e 5 causa uma resposta ao choque ácido, durante o qual as proteínas sintetizadas são diferentes daquelas da tolerância ácida (FOSTER, 1991). Para *Salmonella Typhimurium* se adaptar a condições de pH muito baixo é necessário uma adaptação ácida seqüencial, assim como para se proteger contra um estresse ácido mais severo. Se as células deste microrganismo forem

transferidas diretamente de pH 7 para pH 3, as proteínas do choque ácido não serão sintetizadas e a célula não sobreviverá (BROWN et al., 1997).

A homeostase do pH sozinha não fornece tolerância ácida efetiva. Segundo BEARSON et al. (1997) a síntese de proteínas durante o segundo estágio da resposta de tolerância ácida é necessária para a sobrevivência de *Salmonella* na fase exponencial em condições ácidas. Três proteínas reguladoras (RpoS, Fur e PhoP) que controlam vários sistemas de tolerância ácida já foram identificadas. Cada regulador governa a expressão de um subconjunto distinto de proteínas do choque ácido. O RpoS, descrito anteriormente, regula uma resposta geral ao estresse. O regulon PhoP é conhecido por sua importância para sobrevivência a macrófagos, proteção contra peptídeos antimicrobianos e virulência. O PhoP é também uma proteína do choque ácido usada para proteção contra baixo pH. Outro regulador de tolerância ácida é o regulador de assimilação de ferro (Fur). Na presença de excesso de Fe^{2+} intracelular, esta proteína de 17 kDa reprime a expressão dos genes regulados pelo ferro. O Fur também governa a expressão de várias proteínas do choque ácido. Outros genes com efeitos demonstrados na tolerância ácida incluem o PolA e o Ada envolvidos no reparo do DNA, o FabF envolvido na síntese de ácidos graxos, o receptor protéico cAMP e a ATPase translocadora de prótons dependente de Mg^{2+} (BEARSON et al., 1997).

Para se adaptar e tolerar ambientes de baixo pH, as células tentam alterar o valor do pH externo. *Escherichia coli* expressa enzimas carboxilases preferencialmente em baixo pH (BEALES, 2004). A função de tais enzimas é aumentar o valor do pH externo e contribuir para induzir a tolerância ácida em algumas situações (ROWBURY, 1997). A lisina descarboxilase, codificada pelo gene *cadA*, é uma proteína de 715 aminoácidos que contribui para a homeostase do pH pela conversão exógena de lisina em cadaverina, um produto alcalino que, quando secretado pela célula, neutraliza o ambiente ácido (HALL et al., 1995; ROWBURY, 1997). Por exemplo, o baixo pH induzido pela lisina descarboxilase contribui significativamente para a homeostase do pH em ambientes com pH tão baixo quanto 3 para *Salmonella Typhimurium* (PARK et al., 1996). Para que esta resposta ocorra é requerido tanto lisina descarboxilase quanto proteínas do choque ácido, porém, somente a lisina descarboxilase contribui para a homeostase. A arginina descarboxilase de *E. coli* tem várias propriedades em comum com a lisina descarboxilase, uma vez que ambas aumentam o valor do pH em volta da célula pela remoção dos grupos carboxila e a liberação de CO_2 a partir de seus substratos (HALL et al., 1995; ROWBURY, 1997). O gene *asr* de *E. coli*, que codifica

uma proteína de função desconhecida, tem mostrado ser fortemente induzido pelo aumento da acidez ambiental menor que pH 5. A maioria das proteínas do choque ácido são pouco caracterizadas e seu papel na resposta e sobrevivência ácida é desconhecido.

Para BEALES (2004) existem dois sistemas de proteção ao estresse ácido, a resposta de tolerância ácida induzida pela homeostase do pH e a resposta ao choque ácido, ambas requerem síntese de proteínas. Assim como BEARSON et al. (1997), este autor afirma que *S. Typhimurium* possui diferentes mecanismos de sobrevivência, dependendo se as células estão na fase de crescimento exponencial ou estacionária. O Omp R é um regulador de resposta induzido pela acidez para resposta de tolerância ácida da fase estacionária, mas não da fase exponencial (IEL et al., 2002). O sistema de resposta de tolerância ácida é um fenômeno complexo que envolve inúmeras mudanças em diferentes proteínas e eventos de regulação gênica. Em *Salmonella* spp., a resposta de tolerância ácida envolve a síntese transiente de proteínas do choque ácido (FOSTER, 1991, 1993). Já foram localizados vários loci gênicos envolvidos na sensibilidade e na resposta ao estresse ácido (GAHAN & HILL, 1999).

2.4 Proteção cruzada

A habilidade de uma condição de estresse promover proteção contra outros estresses é referida como proteção cruzada. Diversos autores mostraram que a adaptação ácida confere resistência a uma extensa variedade de condições de estresse incluindo aquecimento e concentração de sal (GARREN et al., 1998; ABEE & WOUTERS, 1999; AUDIA et al., 2001). Respostas de adaptação microbiana a um estresse podem aumentar a resistência a um outro estresse (CHUNG et al., 2006). Células adaptadas à acidez mostram proteção cruzada contra aquecimento e outros estresses (BUCHANAN & EDELSON, 1999; RYU & BEUCHAT, 1999a; RYU & BEUCHAT, 1999b), incluindo sal, peróxido de hidrogênio, cristal violeta e polimixina B, como demonstrado para estirpes de *Salmonella* (LEYER & JOHNSON, 1993; LEE et al., 1994).

MATTICK et al. (2000) investigaram o efeito da habituação à atividade de água reduzida sobre a tolerância térmica em *Salmonella* spp., demonstrando que a redução da atividade de água pode aumentar a tolerância térmica. As bactérias induzem respostas específicas, tanto fisiológicas quanto genéticas, para responder à perda ou ao ganho de água, devido a mudanças na osmoralidade do ambiente (O'BYRNE & BOOTH, 2002).

Vários fatores influenciam a tolerância ácida de um microrganismo como mudanças provocadas pela microbiota competidora, danos causados por tratamentos anteriores tal como aquecimento ou redução da atividade de água. Para muitos microrganismos em ambientes nos quais o pH é menor do que o ótimo, a temperatura mínima de crescimento pode aumentar, com forte interação com atividade de água reduzida (BEALES, 2004).

A proteção cruzada entre diferentes estresses tem sérias implicações na preservação de alimentos, quando múltiplos estresses são frequentemente usados para preservar os produtos (GREENACRE & BROCKLEHURST, 2006). A tolerância térmica, por exemplo, é extremamente afetada pela indução da tolerância ácida (INGHAM & ULJAS, 1998; RYU & BEUCHAT, 1998; MAZZOTTA, 2001).

Além do aquecimento e da concentração de cloreto de sódio, a reposta de tolerância ácida confere resistência cruzada também contra o etanol (LEYER & JOHNSON, 1993; LOU & YOUSEF, 1997), agentes ativos de superfície como cristal violeta (FARBER & PAGOTTO, 1992; LEYER & JOHNSON, 1993) ou estresse osmótico (LEYER & JOHNSON, 1993) e existe evidência que pode aumentar a virulência bacteriana (GAHAN & HILL, 1999). LEYER & JOHNSON (1992, 1993) mostraram que a adaptação ácida de microrganismos pela adição de acidulantes ou em alimentos ácidos aumenta a resistência celular contra vários estresses ambientais que surgem durante o processamento dos alimentos.

BLACKBURN et al. (1997) avaliaram o efeito do baixo pH na resistência térmica de *Salmonella* spp. LEYER e JOHNSON (1993) reportaram que em células de *S. typhimurium* a adaptação ácida promove proteção cruzada contra estresse térmico e osmótico. Tem sido reportado que a adaptação ácida de *Salmonella* amplifica sua sobrevivência em alimentos ácidos, assim como aumenta a proteção cruzada a outros tipos de estresse como o aquecimento (TSAI & INGHAM, 1997; CASADEI et al., 2001; MAZZOTTA, 2001). A remoção do oxigênio protege as salmonelas contra os danos

oxidativos, podendo promover também proteção contra o aquecimento (ALDSWORTH et al., 1998).

Proteção cruzada contra aquecimento em células de *E. coli* O157:H7 adaptadas a acidez pode ocorrer (GARREN et al., 1998; RYU & BEUCHAT, 1998). CHENG e KASPAR (1998) reportaram a influência do cloreto de sódio na tolerância ácida de *E. coli* O157:H7. LEENANON e DRAKE (2001) avaliaram os efeitos da adaptação ácida sobre a resistência térmica de estirpes de *E. coli* patogênicas e não patogênicas. Ao desenvolver resistência ácida e sobreviver em alimentos de baixo pH, a *E. coli* O157:H7 pode adquirir proteção cruzada contra a preservação dos alimentos pelo aquecimento, adição de sal e irradiação (GARREN et al., 1998; RYU et al., 1998).

A superfície de adesão aumenta a resistência ácida (ROWBURY, 1995). A habilidade das enterobactérias em sobreviver em regiões letalmente ácidas, como águas naturais acidificadas e estômago, depende da habilidade em se ligar a partículas ou superfícies, promovendo resistência à morte por acidez (POYNTER et al., 1986). GAWANDE e BHAGWAT (2002) afirmaram que as superfícies de alimentos recém cortados não somente fornecem um suporte sólido para a adesão de patógenos como *Salmonella* spp., mas também exercem um papel crítico no aumento da tolerância ácida do patógeno. As células de *Salmonella* que estão aderidas à superfícies são geralmente mais termorresistentes do que aquelas que não estão aderidas e estão dispersas no alimento ou em caldo (DHIR & DODD, 1995). GAWANDE e BHAGWAT (2002) demonstraram que várias estirpes de *Salmonella* que normalmente morrem em pH 3,0 a 37°C por 2 horas, sobrevivem em idênticas condições quando inoculadas na superfície de alimentos recém cortados. HUMPHREY et al. (1997) verificaram um aumento da resistência térmica de *S. typhimurium* aderidas ao tecido muscular de porcos quando comparado com células livres.

Um outro fator de proteção cruzada em alimentos é a presença de microrganismos competidores. ALDSWORTH et al. (1999) demonstraram que a presença de uma microbiota competidora protege *S. typhimurium* do aquecimento, intensificando sua sobrevivência. Assim como a presença de microrganismos competidores, a composição do alimento pode proteger as células de determinados microrganismos contra os estresses a que são submetidos durante o processamento dos alimentos. Alimentos sólidos, especialmente aqueles ricos em lipídios, podem proteger as salmonelas contra a acidez (WATERMAN & SMALL, 1998).

3 Bioconservação de alimentos

Verifica-se atualmente um aumento do número de consumidores que preferem alimentos minimamente processados, preparados sem conservantes químicos (CLEVELAND et al., 2001; ROSS et al., 2002; ALJARALLAH & ADAMS, 2007). Muitos destes alimentos, prontos para o consumo, representam novos sistemas alimentares em relação aos riscos à saúde e à associação com deterioração. Visando compreender e conhecer a complexidade das interações microbianas, métodos recentes têm sido cada vez mais direcionados para as possibilidades oferecidas pela bioconservação (HOLZAPFEL et al., 1995; GOULD, 1996; ROSS et al., 2002), aumentando o interesse por agentes antimicrobianos produzidos naturalmente (CLEVELAND et al., 2001; LEMAY et al., 2002).

O crescimento, sobrevivência e atividade de qualquer espécie microbiana, sejam de organismos deterioradores não desejáveis, patógenos ou agentes de bioconservação, em muitos casos será determinado pela presença de outras espécies (FLEET, 1999; GIRAFFA, 2003). Para ROSS et al. (2002), está ocorrendo um crescimento do arsenal de bioconservativos potenciais que podem ser usados isoladamente ou em combinação para proteger os alimentos contra patógenos e deterioradores.

Os métodos modernos de preservação biológica ajudam a reduzir os riscos à saúde sem mudar as qualidades sensoriais do produto (HOLZAPFEL et al., 1995). Vários microrganismos já foram avaliados como agentes de bioconservação (JANISIEWICZ & KORSTEN, 2002; NUNES et al., 2002; OBAGWU & KORSTEN, 2003; MEZIANE et al., 2006; CALVO et al., 2007; YU et al., 2007). Atualmente podem ser encontrados variados sistemas comerciais de bioconservação, tais como o Microgard® 100 (SALIH et al., 1990), Microgard® 300 (AL-ZOREKY et al., 1991), nisina (STEVENS et al., 1992), Alta® 2002 (SALIH et al., 1990; AL-ZOREKY et al., 1991) e Perlac® 1902 (SALIH et al., 1990; AL-ZOREKY et al., 1991).

Com o maior conhecimento da complexidade das interações microbianas, combinado a fatores de preservação existentes nos sistemas alimentares, novos métodos têm possibilitado a preservação biológica com o uso das chamadas culturas protetoras (HOLZAPFEL et al., 1995). DEVLIEGHERE et al. (2003) definem o termo cultura protetora como sendo culturas antagonistas que são adicionadas no alimento apenas para inibir patógenos e prolongar a vida de prateleira, causando poucas

mudanças nas propriedades sensoriais do produto, sendo o efeito antagonista relacionado com a inibição de outros microrganismos pela competição por nutrientes e pela produção de muitos metabólitos antimicrobianos ativos. HOLZAPFEL et al. (1995) discutem mecanismos básicos de inibição por culturas protetoras, especial referência é feita às bactérias do ácido láctico.

As bactérias do ácido láctico são promissoras como culturas protetoras, sendo a maioria dos representantes desse grupo de bactérias inofensivos à saúde humana, e algumas são reconhecidas como “GRAS” (Generally Recognised As Safe). Algumas destas bactérias são usadas como probióticos e podem fornecer benefícios substanciais à saúde humana como estabilizar e normalizar o trato gastrointestinal. Algumas estirpes estão associadas com ação anticancerígena e controle de tumores. Estas características relacionadas à saúde podem servir como uma vantagem adicional na futura seleção e aplicação de culturas protetoras. Os avanços e o aumento do conhecimento da fisiologia e biologia molecular das bactérias do ácido láctico, somando-se ao progresso nas técnicas de seleção e de cultura, dão razão ao otimismo em relação ao desenvolvimento de culturas protetoras melhoradas (HOLZAPFEL et al., 1995). HELANDER et al. (1997) testaram o uso potencial de bactérias do ácido láctico contra bactérias Gram negativas.

HUGAS (1998) demonstrou que a bioconservação aumenta a vida de prateleira e segurança de carnes e derivados através do uso de uma microbiota natural ou controlada, principalmente bactérias do ácido láctico. Para ADAMS e NICOLAIDES (1997) ao usar bactérias do ácido láctico para segurança alimentar, com exceção de enterococos, o risco de infecção é muito baixo, particularmente tendo em vista a ocorrência destas bactérias em número substancial em carnes e vegetais e seu uso desde a antiguidade na produção de uma grande variedade de produtos fermentados, onde elas ocorrem em grande número. Exemplos de inibição de deterioradores e patógenos por bactérias do ácido láctico podem ser encontrados em KLAENHAMMER (1988) e HOLZAPFEL et al. (1995).

Alguns autores demonstraram os fatores que contribuem para atividade antimicrobiana das bactérias do ácido láctico (LINDGREN & DOBROGOSZ, 1990; HOLZAPFEL et al., 1995; ADAMS & NICOLAIDES, 1997). AMMOR et al. (2006a) testaram as atividades antibacterianas das bactérias do ácido láctico contra microrganismos indicadores e patogênicos isolados de instalações processadoras de alimento, com objetivo de selecionar estirpes de interesse que pudessem ser usadas

como bioconservadoras. AMMOR et al. (2006b) sugerem a possibilidade de uso de bioconservadores no controle de biofilmes formados por microrganismos indesejáveis. TOPISIROVIC et al. (2006) também demonstraram o potencial das bactérias do ácido láctico na conservação de alimentos.

DEVLIEGHERE et al. (2003) afirmaram que os estudos com culturas bacteriogênicas têm sido focalizados principalmente na inibição de patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes*, pouco se conhecendo sobre a atividade destas culturas protetoras contra organismos deterioradores específicos em diferentes tipos de alimentos. Recentes avanços na biologia molecular de bactérias do ácido láctico estão permitindo um melhor desenvolvimento de culturas protetoras feitas sob medida, portanto, é necessário que as futuras pesquisas na área de culturas bacteriogênicas se focalizem na melhor seleção de alvos e dos métodos de investigação.

Uma alternativa ao uso de culturas bacteriogênicas é a utilização de culturas altamente competitivas como *Lactobacillus alimentarius* (ANDERSEN, 1995), *Lactobacillus sakei* (BREDHOLT et al., 2001; TANTILLO et al., 2002), *Lactococcus lactis* (DEVLIEGHERE et al., 2003), *Lactobacillus plantarum* (BERNBOM et al., 2006) e *Lactobacillus acidophilus* (CHIODA et al., 2007). Uma das hipóteses do caráter antagonista destas culturas, proposta por JUVEN et al. (1998), baseia-se na produção de ácido láctico que provocaria a acidificação, detendo o crescimento de bactérias deterioradoras e patogênicas. Na inibição de patógenos pós-colheita de frutos, COSTA et al. (2002) demonstraram a ação de bactérias do ácido láctico como cultura protetora, reforçando a afirmação de ABEE et al. (1995) de que essas bactérias são as melhores candidatas para bioconservação de alimentos. Entretanto, DEVLIEGHERE et al. (2003) reconheceram que uma explicação mais completa desta inibição provavelmente é mais complexa, podendo ocorrer devido à combinação de efeitos tais como a produção de antimicrobianos e a competição pelo esgotamento de nutrientes específicos.

O controle biológico de bactérias e leveduras indesejáveis pode ser feito também por meio de culturas de leveduras. Avaliando leveduras “predadoras”, PALPACELLI et al. (1991) testaram a atividade desses microrganismos contra outras leveduras que causam problemas na indústria de alimentos. O caráter “predador” já foi identificado em *Saccharomyces cerevisiae* (HEARD & FLEET, 1987), nos gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Torulopsis* (ROSINI, 1985; ROSINI & CANTINI, 1987; MASIH et al., 2001) e nas espécies *Debaryomyces hansenii* e

Torulaspota delbrueckii (PSANI & KOTZEKIDOU, 2006). CIANI e FATICHENTI (2001) afirmaram que o gênero *Kluyveromyces* tem potencial como um agente biopreservativo na fabricação de vinho. SANTOS et al. (2004) demonstraram a capacidade prática e efetiva de espécies do gênero *Pichia* de atuarem como agente de biocontrole. WALKER et al. (1995) verificaram interações entre leveduras predadoras e fungos patogênicos de significância agronômica, clínica e ambiental.

Dois produtos comerciais, o Aspire (baseado em *Candida oleophila*) e o Yield Plus (baseado em *Cryptococcus albidus*), estão registrados para uso nos Estados Unidos, África do Sul e Israel (JANISIEWICZ & KORSTEN, 2002; FRAVEL, 2005). DROBY et al. (1998) e DROBY et al. (2003) testaram o “Aspire” no controle pós-colheita de frutas e verificaram que o produto fornece controle equivalente ao de fungicidas sintéticos. PASSOTH et al. (2006) também citam preparações comerciais de leveduras disponíveis para o controle pré e pós-colheita de frutas. A levedura *Cryptococcus laurentii* também foi avaliada como potencial agente de bioconservação (YU & ZHENG, 2006; YU et al., 2007; YU & ZHENG, 2007).

Somando-se aos mais tradicionais e emergentes sistemas empregados para se obter uma vida de prateleira desejável existe a pressão dos consumidores por meios mais naturais para a conservação dos alimentos (ROBERTS, 1995; ROLLER, 1995; GOULD, 1996). Este fato tem concentrado atenção em uma extensa faixa de sistemas antimicrobianos naturais extremamente efetivos que podem ser explorados para o uso em alimentos (GOULD, 1996). A dinâmica desses sistemas pode contribuir de diversas maneiras para o controle de patógenos e melhoria da qualidade sensorial dos alimentos.

4 Identificação de bactérias lácticas e leveduras

4.1 Sistema API 50 CHL para identificação de bactérias lácticas

O API 50 CHL é um sistema padronizado que associa 50 testes bioquímicos para o estudo do metabolismo dos hidratos de carbono dos microrganismos. É utilizado para a identificação dos *Lactobacillus* e semelhantes. O sistema é constituído de 50 microtubos para o estudo da fermentação de substratos pertencentes à família dos carboidratos e derivados (heterosídeos, polióis, ácidos urônicos). Durante o período de incubação a fermentação traduz-se por uma alteração de cor no tubo, devido a uma

produção de ácido em anaerobiose revelada pelo indicador de pH do meio escolhido. O primeiro tubo, sem princípio ativo, serve de controle negativo. Os resultados, positivos e negativos, são utilizados para identificação dos microrganismos através do sistema apiweb™ (BioMerieux), que usa o princípio de codificação e condensação das informações binárias, num perfil numérico.

Os testes bioquímicos avaliados pelo sistema são: glicerol, eritritol, D-arabinose, L-arabinose, ribose, D-xilose, L-xilose, adonitol, β-metil-D-xilosídeo, galactose, glicose, frutose, manose, sorbose, ramnose, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α-metil-D-manosídeo, α-metil-D-glicosídeo, N-acetil-glicosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiose, maltose, lactose, melibiose, sacarose, trealose, inulina, melezitose, rafinose, amido, glicogênio, xilitol, gentiobiose, D-turanose, D-lixose, D-tagatose, D-fucose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol, gliconato, 2-ceto-gliconato, 5-ceto-gliconato.

O sistema serve como uma importante ferramenta na identificação de lactobacilos (MOLIN et al., 1993). VANDAMME et al. (1996) indicaram sua aplicação mais extensa para taxonomia como um procedimento fenotípico eficiente capaz de discriminar diferenças entre estirpes. Os resultados gerados por este sistema têm sido utilizados para suportar dados de taxonomia para lactobacilos em alimentos (NIGATU et al., 2000; MUYANJA et al., 2003; CONTER et al., 2005; ADNAN & TAN, 2007).

4.2 Sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC para identificação de leveduras

O sistema API 20 C AUX engloba vinte cúpulas que contém substratos desidratados para efetuar dezenove testes de assimilação. As cúpulas são inoculadas com um meio mínimo semigelatinoso e as leveduras crescem apenas se forem capazes de utilizar o substrato correspondente. A leitura dessas reações é feita por comparação com os controles de crescimento e a identificação obtida consultando o sistema de identificação apiweb™ (BioMerieux).

Neste sistema de identificação são avaliadas 21 características (20 bioquímicas e uma morfológica) separadas em 7 grupos de três e a cada reação positiva é atribuído um valor numérico, compondo um código de 7 dígitos. Este código corresponde à identificação percentual das espécies. As características avaliadas são: glicose, glicerol, 2-ceto-D-gluconato, arabinose, xilose, adonitol, xilitol, galactose, inositol, sorbitol, metil-D-glicosídeo, N-acetil-glicosamina, celobiose, lactose, maltose, sacarose,

trealose, melezitose, rafinose e presença de hifas. As identificações são listadas no sistema apiwebTM como excelente (%id ≥ 99,9), muito boa (%id ≥ 99,0) ou aceitável (%id ≥ 90,0). Vários autores já utilizaram o sistema API 20 C AUX na identificação de leveduras em alimentos (TORREZAN et al., 2000; TRINDADE et al., 2002; TOURNAS & KATSODAS, 2005; RASPOR et al., 2006; TOURNAS et al., 2006).

O sistema VITEK YBC monitora reações metabólicas em cartões YBC (Yeast Biochemical Card), contendo 26 testes bioquímicos convencionais, sendo estes: glicose, glicerol, 2-ceto-D-gluconato, L-arabinose, xilose, adonitol, xilitol, galactose, inositol, sorbitol, metil-D-glicosídeo, N-acetil-D-glicosamina, celobiose, lactose, maltose, sacarose, trealose, melezitose, rafinose, dulcitol, palatinose, eritritol, melibiose, nitrato, inibição por cicloheximida e produção de urease.

O sistema abastece e sela automaticamente os cartões, transferindo-os para um incubador. Após a incubação por 24 horas a 30°C, os perfis metabólicos são comparados com o banco de dados do sistema. Cada perfil é interpretado de acordo com um algoritmo específico, permitindo a identificação final do microrganismo. Diversos autores identificaram leveduras utilizando o sistema VITEK YBC (EL-ZAATARI et al., 1990; FENN et al., 1994; GALES et al., 1999; WADLIN et al., 1999; ENCINAS et al., 2000).

CAPÍTULO I - QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE CONSERVAS DE POLPA DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.) COMERCIALIZADAS NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DE MINAS GERAIS¹

RESUMO

A qualidade microbiológica de conservas de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) foi avaliada pela contagem de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, coliformes totais, enterobactérias, *Staphylococcus* spp. e clostrídeos sulfito-redutores, assim como pela detecção de *Salmonella* spp. A incidência total de microrganismos aeróbios variou de $4,6 \times 10^3$ UFC/g a $9,8 \times 10^4$ UFC/g, e de $4,1 \times 10^4$ UFC/g a $9,7 \times 10^4$ UFC/g para bolores e leveduras. Foi observado um baixo nível de contaminação por bactérias coliformes e enterobactérias (< 10 UFC/g), porém, a presença de células injuriadas destes microrganismos foi demonstrada. A presença de *Staphylococcus aureus* e clostrídeos sulfito-redutores não foi observada. *Salmonella* spp. foi encontrada em 33,3% das amostras analisadas, indicando que o produto pode representar um risco a saúde pública. As contagens totais de mesofílicos aeróbios e de bolores e leveduras nas amostras sugerem condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento do produto, diminuindo assim sua vida de prateleira e sua qualidade microbiológica.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense*; conservas de pequi; qualidade microbiológica; riscos microbiológicos.

ABSTRACT

The microbiological quality of preserves made from the pulp of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), a typical Brazilian fruit, was performed based on the total aerobic mesophilic bacteria, yeast and mould, total coliform bacteria, enterobacteria, *Staphylococcus* spp. and sulfite-reducing clostridia counts, as well as the detection of *Salmonella* spp. The incidence of total aerobic microorganisms varied from 4.6×10^3

¹ World J Microbiol Biotechnol (2007) 23:1179-1181, conforme apêndice I.

CFU/g to 9.8×10^4 CFU/g, and from 4.1×10^4 CFU/g to 9.7×10^4 CFU/g for yeasts and moulds. A low level of contamination (< 10 CFU/g) by coliform bacteria and enterobacteria was observed, however the presence of injured cells of these microorganisms was demonstrated. The presence of *Staphylococcus aureus* and sulfite-reducing clostridia was not observed. *Salmonella* spp. was found in 33.3% of the samples analyzed, indicating that the product can represent a public health risk. The total aerobic mesophilic, yeast and mould counts in the samples suggest inadequate sanitary and hygienic conditions during the processing of the product, thereby decreasing its shelf life and its microbiological quality.

Keywords: *Caryocar brasiliense*; microbial hazards; microbiological quality; pequi preserves.

1 INTRODUÇÃO

O pequizeiro é uma frutífera nativa do cerrado encontrada em grande abundância na região norte do estado de Minas Gerais (ARAÚJO, 1995), sendo seus frutos comercializados de forma *in natura* processados. O fruto do pequizeiro é apreciado como alimento principalmente devido às características sensoriais e nutricionais de sua polpa (DOMBROSKI, 1997). A utilização culinária da polpa do pequi é muito comum nesta região, podendo ser consumida com outros alimentos. Além do consumo para subsistência, o pequi é utilizado para a fabricação de vários produtos derivados, entre estes se destacam as conservas caseiras e industriais (ALMEIDA et al., 1998), que aumentam a renda de comunidades rurais, como no município de Japonvar-MG (POZO, 1997).

No norte de Minas Gerais, as conservas de polpa de pequi são processadas de forma artesanal ou industrial. Nas indústrias desta região, o processo de fabricação das conservas envolve principalmente as seguintes etapas: limpeza dos frutos *in natura*, separação das sementes, seleção e classificação, lavagem, despulpamento, branqueamento, resfriamento, enchimentos das embalagens de vidro, adição de salmoura acidificada com ácido cítrico, adição do conservante benzoato de sódio, deaeração, selagem e tratamento térmico para pasteurização.

Todas as etapas do processamento das conservas de polpa de pequi afetam suas características fisiológicas e biológicas, podendo retardar a deterioração e melhorar a segurança microbiológica do produto final. O pequi é um fruto considerado de baixa acidez por apresentar pH médio entre 5,0 e 7,0 (VERA et al., 2005; VERA et al., 2007), portanto, as conservas devem ser suficientemente acidificadas para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, especialmente o *Clostridium botulinum*, que cresce em meios com pH acima de 4,6 (LUND et al., 1987).

As conservas de polpa de pequi produzidas na região norte do estado de Minas Gerais são comercializadas na própria região e também em outras regiões do estado e do país. Recentemente este produto começou a ser exportado para outros países como os Estados Unidos, através da Cooperativa dos Produtores Rurais e Catadores de Pequi de Japonvar (COOPERJAP). Porém, ainda não existem registros sobre a qualidade microbiológica das conservas, justificando deste modo, pesquisas que possam avaliar a segurança deste produto e seus riscos para saúde pública, uma vez que o consumo tem aumentado nos últimos anos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Dez amostras de conservas de polpa de pequi pesando 140 g (peso drenado) de três marcas comerciais diferentes foram analisadas, totalizando 30 amostras. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade determinado pelos fabricantes (12 meses) e foram mantidas a temperatura ambiente. As conservas (25 g) foram avaliadas de acordo com as contagens de mesófilos aeróbios totais, bolores e leveduras, coliformes totais, enterobactérias, *Staphylococcus aureus* e clostrídeos sulfito-redutores, além da pesquisa de *Salmonella* spp.

As contagens de mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, enterobactérias, bactérias coliformes e *Staphylococcus aureus*, foram feitas pelo método de espalhamento em superfície (APHA, 1992) utilizando, respectivamente, os meios tryptic soy agar (TSA - Difco, Sparks, USA), potato dextrose agar (PDA - Oxoid, Basingstoke, UK) acidificado (pH 3,5), MacConkey agar (Acumedia, Lansing, USA), violet red bile agar (VRB - Oxoid, Basingstoke, UK) e Baird-Parker agar (BP - Merck, Darmstadt, Germany) suplementado com gema de ovo e telurito de potássio.

As placas foram incubadas a 35°C por 24 - 48 horas para a contagem de mesófilos aeróbios, 25°C por 3 - 5 dias para bolores e leveduras e 37°C por 24 - 48 horas para enterobactérias, bactérias coliformes e *Staphylococcus aureus*. A contagem de clostrídios sulfito-redutores foi feita em placas de Tryptose Sulfite Ciclocerin agar (TSC - Micromed, Duque de Caxias, Brasil), incubadas a 37°C por 24 - 48 horas em condições de anaerobiose obtida pela utilização do sistema Anaerobac® (Probac, São Paulo, Brasil). Todos os resultados foram expressos como Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de polpa de pequi.

Para pesquisa de *Salmonella*, amostras de vinte e cinco gramas de polpa de pequi foram homogeneizadas em água peptonada tamponada (Acumedia, Baltimore, USA). O enriquecimento seletivo foi realizado nos caldos tetratoato (Acumedia, Lansing, USA) e selenito cistina (Acumedia, Lansing, USA) e o isolamento foi feito nos meios ágar Hektoen (Acumedia, Lansing, USA), ágar bismuto sulfito (Acumedia, Lansing, USA) e ágar xilose lisina desoxicolato (Acumedia, Lansing, USA). As colônias presuntivas de *Salmonella* foram inoculadas em ágar ferro lisina (Acumedia, Lansing, USA) e ágar tríplice açúcar ferro (Acumedia, Lansing, USA). As colônias típicas foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: indol, lactose, dulcitol, catalase, malonato, citrato, vermelho de metil e Voges-Proskauer (APHA, 1992). *Salmonella* spp. foi confirmada por teste sorológico usando antisoro polivalente *Salmonella* H (Difco, Sparks, USA).

A presença de células injuriadas de enterobactérias e bactérias coliformes totais foi investigada em cinco amostras de cada marca. As amostras foram enriquecidas a 37°C por 3 horas em caldo tryptic soy (TSB - Difco, Sparks, USA), seguido por plaqueamento em ágar MacConkey (para enterobactérias), ágar VRB (para bactérias coliformes) e ágar TSA (para crescimento não seletivo), sendo todos os meios incubados a 37°C por 24 horas. As contagens foram comparadas com aquelas obtidas por plaqueamento direto nos mesmos meios sem enriquecimento prévio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As contagens de mesofílicos aeróbios e de bolores e leveduras são mostradas na Tabela I.1 para as três marcas (A, B e C) de conservas de polpa de pequi. A marca A apresentou baixas contagens em relação às marcas B e C para ambos os grupos de microrganismos, sugerindo que existiram diferentes condições higiênico-sanitárias nas indústrias de processamento. Embora as contagens destes grupos de microrganismos normalmente não constituam critério de rejeição (PHLS, 2000), quanto maiores as contagens, maior a probabilidade de se encontrar microrganismos patogênicos. A contagem de microrganismos aeróbios mesofílicos em um alimento reflete a qualidade da matéria-prima, assim como do processamento, manipulação e condições de estocagem (ICMSF, 2001). A legislação brasileira (ANVISA, 2001) não estabelece critérios microbiológicos para contagem de bactérias mesófilas aeróbias neste produto. Baseado em padrões irlandeses para mesofílicos aeróbios em produtos vegetais cozidos (IRELAND, 2001), somente a marca A apresentou uma carga microbiana aceitável ($< 10^4$ UFC/g).

Tabela I.1 – Contagens de aeróbios mesofílicos e de bolores e leveduras em três marcas comerciais de conservas de polpa de pequi

Marca	Contagem Microbiana (\log_{10} UFC/g)*	
	Bactérias Aeróbicas Mesofílicas	Bolores e Leveduras
A	$3,68 \pm 0,04^b$ (3,65 – 3,74)	$4,61 \pm 0,04^b$ (4,55 – 4,68)
B	$4,97 \pm 0,02^a$ (4,93 – 4,99)	$4,98 \pm 0,02^a$ (4,96 – 4,98)
C	$4,97 \pm 0,01^a$ (4,96 – 4,98)	$4,98 \pm 0,01^a$ (4,97 – 4,99)

*Médias \pm desvios-padrão e faixas, entre parênteses, para três replicatas de 25 g para cada uma das 10 amostras de cada marca; as médias indicadas com a mesma letra não foram significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), após análise de variância aplicada a delineamento inteiramente casualizado.

As contagens de bactérias coliformes e enterobactérias nas amostras demonstraram baixo grau de contaminação (< 10 UFC/g) nas três marcas. A contagem destas bactérias normalmente é usada para o monitoramento microbiológico de alimentos processados, onde sua presença está relacionada tradicionalmente tanto com falta de higiene quanto por práticas sem segurança (ZEITOUN et al., 1994). A contaminação por *Staphylococcus aureus* e clostrídeos sulfito-redutores não foi observada nas amostras.

Com respeito a *Salmonella* spp., os resultados demonstraram a presença deste microrganismo em 33,3% do total de amostras. *Salmonella* spp. foi detectada em 60% das amostras de conserva da marca B, em 40% da marca C e nenhuma da marca A (Tabela I.2). *Salmonella* tem sido relacionada a frutas e vegetais (BEUCHAT, 1995; JOHANNESSEN et al., 2002; TAUXE et al., 1997; THUNBERG et al., 2002), sendo sua prevalência na contaminação destes produtos de 0,2 - 10% (RUIZ et al., 1987; WELLS & BUTTERFIELD, 1997; SAGOO et al., 2003), assim o risco potencial destas bactérias não deve ser subestimado, particularmente em alimentos levemente cozidos (SALLEH et al., 2003).

Tabela I.2 – Incidência de *Salmonella* spp. em três marcas comerciais de conservas de polpa de pequi

Marcas	Porcentagem de amostras positivas (%)*
A	0
B	60
C	40

* Três replicatas de 25 g para cada uma de dez amostras por marca.

O pH das conservas variou de 3,36 a 4,31, e a persistência de *Salmonella*, cujo pH mínimo de crescimento é 3,5 (ICMSF, 1980) seria possível nesta faixa. Fundamentalmente, não era esperada a detecção de *Salmonella* uma vez que as conservas são submetidas a tratamento térmico. Embora a adaptação de *Salmonella* em alimentos ácidos possa aumentar sua resistência contra os estresses ambientais que ocorrem durante o processamento (LEYER & JOHNSON, 1993), a sobrevivência destas bactérias em algumas amostras sugere que o processamento não foi executado apropriadamente para garantir a segurança microbiológica das conservas de pequi.

Todas as amostras analisadas apresentaram baixas contagens de enterobactérias e bactérias coliformes. Esses microrganismos foram detectados usando o método de plaqueamento direto sem recuperação de injúria. Porém, a presença de *Salmonella* spp. em algumas amostras sugere a ocorrência de microrganismos injuriados. Portanto, as contagens destes microrganismos foram acompanhadas com a aplicação de um método de recuperação de injúria baseado no enriquecimento prévio das amostras em caldo não seletivo. O procedimento não promoveu o crescimento dos microrganismos, uma vez que não ocorreu diferença significativa ($p > 0,05$) nas contagens de mesófilos aeróbios em ágar não seletivo antes e após o enriquecimento para todas as amostras analisadas (Tabela I.3). Por outro lado, diferenças significativas ($p < 0,05$) na contagem de bactérias coliformes e enterobactérias em meio seletivo antes e após o enriquecimento foram observadas para as marcas B e C, demonstrando assim a ocorrência de recuperação de injúria nestas amostras (Figuras I.1 e I.3). A presença de microrganismos injuriados não foi demonstrada para a marca A. Esta observação confirmou a declaração anterior de que a qualidade higiênico-sanitária desta marca é melhor do que a das outras avaliadas.

Tabela I.3 - Comparação das contagens de mesófilos aeróbios em agar tryptic soy (TSA) antes e após o enriquecimento em caldo tryptic soy (TSB) nas diferentes marcas de conservas de polpa de pequi

Marca	Contagem Microbiana (\log_{10} UFC/mL)	
	Antes	Depois
A	3,69 ± 0,06	3,69 ± 0,03
B	3,97 ± 0,02	3,98 ± 0,03
C	3,98 ± 0,01	3,98 ± 0,01

As médias ± desvios-padrão para 10 amostras de cada marca não diferiram significativamente ($p > 0,05$) por análise de variância para delineamento inteiramente causalizado.

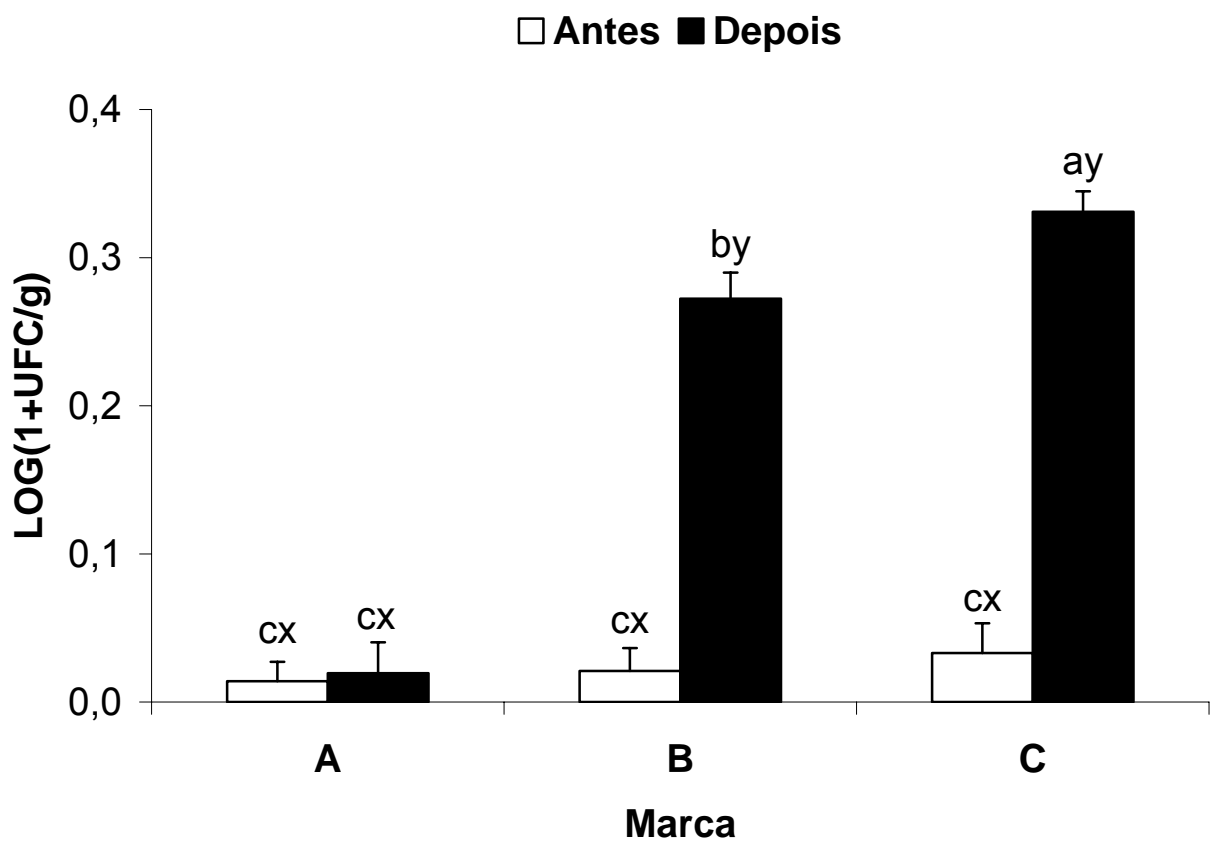


Figura I.1 - Recuperação de bactérias coliformes de diferentes marcas de conservas de polpa de pequi com ágar VRB antes e após o enriquecimento em caldo TSB.

As médias indicadas com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), após análise de variância aplicada a esquema fatorial 3x2 (marca x enriquecimento). As letras a, b, c foram usadas para comparar as marcas na mesma condição de enriquecimento e x, y para comparar as contagens antes e após o enriquecimento na mesma marca.

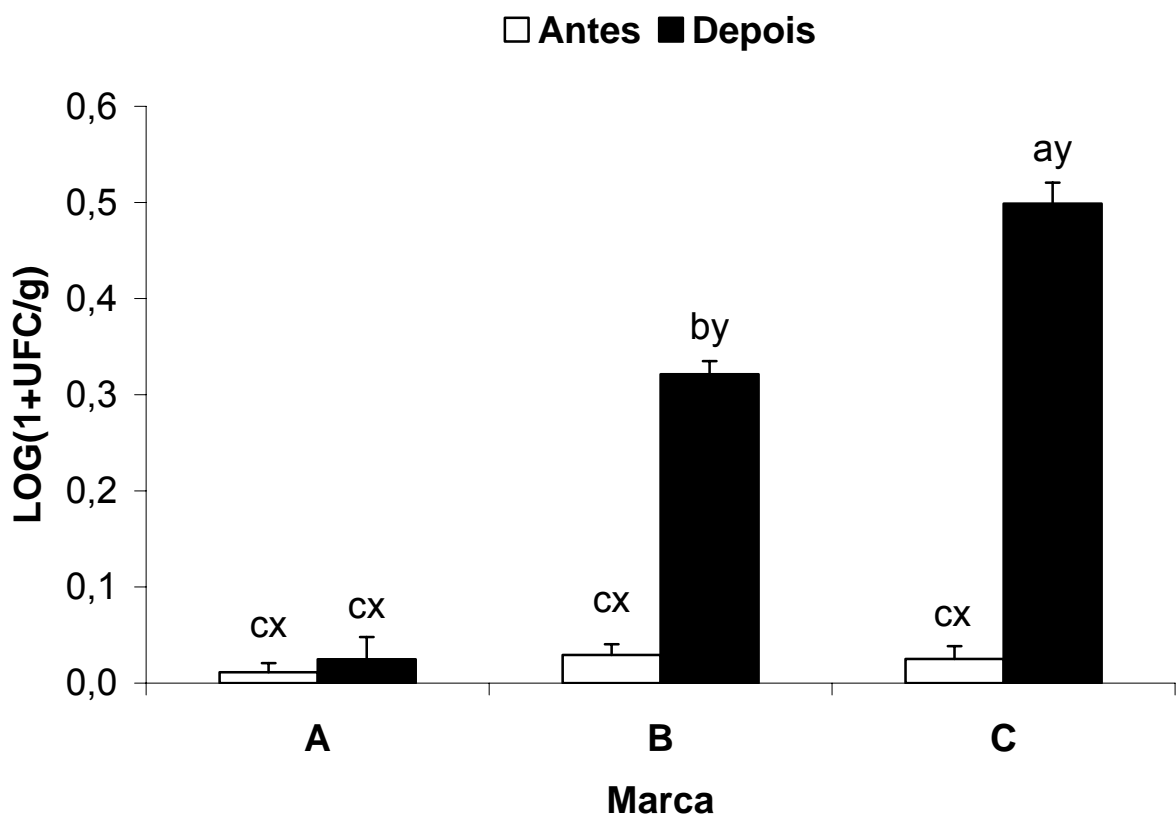


Figura I.2 - Recuperação de enterobactérias de diferentes marcas de conservas de polpa de pequi com ágar McConkey antes e após o enriquecimento em caldo TSB.

As médias indicadas com letras diferentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), após análise de variância aplicada a esquema fatorial 3x2 (marca x enriquecimento). As letras a, b, c foram usadas para comparar as marcas na mesma condição de enriquecimento e x, y para comparar as contagens antes e após o enriquecimento na mesma marca.

Os resultados deste trabalho demonstram a necessidade de avaliação de todo o processo de produção das conservas de polpa de pequi, tais como tratamento térmico, eficiência das soluções conservantes e práticas de fabricação. A melhoria no processamento será importante na redução da carga microbiana geral, prolongamento da vida de prateleira e garantia de segurança do produto. A sobrevivência de *Salmonella* spp. em algumas amostras é um resultado significativo. Uma vez que as conservas de polpa de pequi são consumidas por um grande número de pessoas, é possível ocorrer surtos de doenças de origem alimentar devido a *Salmonella* spp.

4 CONCLUSÕES

A presença de *Salmonella* spp. foi verificada em 33,3% das amostras analisadas, classificando estas amostras como impróprias para o consumo. Além da presença de *Salmonella* spp., as contagens de aeróbios mesofílicos totais e de bolores e leveduras indicam que o processamento foi realizado em condições higiênico-sanitárias precárias. Estes resultados apontam para a necessidade de melhoria na produção de conservas de polpa de pequi para garantia de segurança do produto.

CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS DE UMA INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE CONSERVAS DE POLPA DE PEQUI NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DE MINAS GERAIS²

RESUMO

Foi realizada uma avaliação das condições higiênico-sanitárias de uma indústria de processamento de conservas de polpa de pequi da região norte do estado de Minas Gerais. Foram avaliadas as microbiotas da polpa do fruto do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) *in natura*, da polpa manipulada antes do branqueamento, da polpa armazenada após o branqueamento, das mãos dos manipuladores, das superfícies de manipulação, do ambiente e da água usada no processamento, considerando-se a quantificação de bactérias mesófilas aeróbias, bolores e leveduras, enterobactérias, coliformes totais e coliformes a 45°C, além da pesquisa de bactérias potencialmente patogênicas, tais como *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva. Em proporções variáveis, verificou-se a presença de microrganismos deterioradores, patógenos e daqueles indicadores de contaminação de origem fecal. Demonstrou-se ineficiência dos procedimentos de higiene pessoal e de sanitização das superfícies de manipulação. A água usada pela indústria não estava em conformidade com os padrões bacteriológicos de potabilidade estabelecidos pela legislação brasileira. Os resultados obtidos alertam para a necessidade de implementação de um sistema de monitoramento microbiológico na área de processamento das conservas de polpa de pequi, incluindo equipamentos, utensílios, superfícies, ar, água e os manipuladores. A implementação das Boas Práticas de Fabricação é uma ferramenta essencial a ser utilizada pela indústria avaliada para garantir a segurança do produto final.

Palavras-chave: avaliação microbiológica; boas práticas de fabricação; conservas de pequi; riscos microbianos.

² Artigo submetido à publicação na Revista Ciência e Agrotecnologia (Lavras) em 12/07/2006.

ABSTRACT

An evaluation of the hygienic-sanitary conditions of a processing industry of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp preserve located in the northern area of the state of Minas Gerais was accomplished. The microbial load of the pulp of the fruit *in natura*, the freshly detached pulp, the pulp stored after the bleaching, hands of handlers, surfaces in contact with the pulp, air, and water were evaluated. The following analysis were carried out: total aerobic mesophilic bacteria, yeast and mould, enterobacteria, total coliform and coliform bacteria at 45°C, as well as the research of bacteria potentially pathogenic, such as *Salmonella* spp. and *Staphylococcus* coagulase positive. In variable proportions, the presence of indicators of fecal contamination, pathogenic and spoilage microorganisms were verified. Inefficiency of the procedures of personal hygiene and sanitization of the manipulation surfaces was demonstrated. The water used by the industry was in non-conformance with the bacteriological standards required by the Brazilian legislation. The results alert for the need of implementation of a microbiologic monitoring system in the pequi pulp preserves processing area, including equipments, utensils, surfaces, air, water and the handlers. The implementation of Good Manufacturing Practices will be an essential tool for the evaluated industry to assure safety of the final product.

Keywords: good manufacturing practices; microbiological evaluation; microbial hazards; pequi preserves.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o pequi é um fruto de grande significância e seu uso como alimento é importante para muitas populações rurais, além de constituir uma importante fonte de renda e emprego (ALMEIDA et al., 1998; LIMA 1980). A produção de pequi no Brasil em 2005 chegou a 5.089 toneladas, gerando uma renda de R\$ 4.284.000,00 (IBGE, 2007). A comercialização de pequi na Central de Abastecimento do estado de Minas Gerais em 2005 alcançou 327.895 kg (CEASAMINAS, 2006).

Na região norte do estado de Minas Gerais o pequi é um fruto de grande importância e seu extrativismo é relevante para a alimentação das populações locais, além de constituir-se em fonte significativa de renda e emprego, representando até 40% da renda anual do trabalhador rural de alguns municípios da região, como Japonvar, apenas no período de safra (POZO, 1997). A produção de pequi desta região é destinada para o suprimento do mercado *in natura* e para industrialização de derivados, principalmente as conservas de polpa de pequi.

O processamento de conservas de polpa de pequi geralmente não exige muita sofisticação de equipamentos e instalações (ALMEIDA et al., 1987) e na região norte do Estado de Minas Gerais esse processamento é realizado frequentemente de maneira artesanal. Várias indústrias processadoras de conservas de pequi estão sendo implantadas nesta região, através de cooperativas ou associações comunitárias, porém, a carência de assistência técnica qualificada, ausência de programas de garantia de qualidade e não observação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) pode originar produtos sem garantia de segurança microbiológica, expondo os consumidores a riscos potenciais.

É reconhecido mundialmente que as BPF são uma ferramenta essencial para garantir a inocuidade e a segurança dos alimentos consumidos. As BPF se constituem em um conjunto de princípios e regras para o correto manuseio de alimentos, abrangendo desde as matérias primas até o produto final (OPAS, 2001). Para monitoração das BPF, a análise microbiológica é fundamental e a amostragem deve corresponder aos pontos de contaminação (APHA, 1992; CUNHA et al., 2000).

TORREZAN et al. (2000) afirmam que a contaminação microbiana de frutas industrializadas é proveniente principalmente do ar de áreas de processamento, da água usada na indústria, de superfícies de contato com o alimento e das condições higiênico-sanitárias dos manipuladores. Durante a produção, o ar pode contaminar os alimentos com patógenos ou microrganismos deterioradores presentes em aerossóis (SALUSTIANO et al., 2003).

Toda a água que entra em contato com o alimento ou com superfícies de manipulação deve ser potável e de qualidade sanitária adequada. Independente de sua fonte, se de rede pública ou particular, o abastecimento de água deve ser freqüentemente monitorado (OPAS, 2001).

As superfícies de processamento do alimento podem suportar o crescimento de microrganismos e tornar-se uma fonte de contaminação (SALUSTIANO et al., 2003). Certos microrganismos, incluindo alguns patógenos, podem se adaptar a condições rigorosas ao formarem biofilmes (KUMAR & ANAND, 1998). Quanto aos manipuladores, estes podem ser portadores de formas vegetativas de bactérias patogênicas.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, até 26% dos surtos de doenças de origem alimentar são vinculados aos manipuladores e, portanto, o seu treinamento em segurança alimentar é uma das intervenções mais críticas na prevenção de doenças de origem alimentar (WHO, 2007).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as condições higiênico-sanitárias no processamento de conservas de polpa de pequi em uma indústria da região norte do estado de Minas Gerais, determinando as condições microbiológicas da matéria-prima, das mãos dos manipuladores, das superfícies de manipulação, do ambiente e da água usada durante o processamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta das amostras

Foram coletadas em uma indústria de processamento de conservas de polpa de pequi da região norte do Estado de Minas Gerais amostras da polpa do pequi *in natura*, polpa manipulada antes do branqueamento, polpa armazenada em salmoura após o branqueamento, mãos dos manipuladores, superfícies de manipulação, ambiente e água utilizada dentro da indústria. As amostras foram coletadas no local de processamento e transportadas, em caixa isotérmica, até o laboratório.

2.2 Análises microbiológicas

Foram realizadas as contagens de aeróbios mesofílicos, bolores e leveduras, enterobactérias, coliformes totais, coliformes a 45°C, pesquisa de *Salmonella* spp., pesquisa e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, segundo metodologias descritas no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods

(APHA, 1992). O experimento foi conduzido com três repetições para cada determinação microbiológica.

A contagem de aeróbios mesofílicos foi realizada por espalhamento em superfície de ágar tripticase de soja (TSA - Difco, Sparks, USA) e incubação a 35°C por 24 a 48 horas. Bolores e leveduras foram contados por espalhamento em superfície de ágar batata dextrose (BDA - Oxoid, Basingstoke, UK) acidificado e incubado a 25°C por 3 a 5 dias. A contagem de enterobactérias foi feita por espalhamento em superfície de ágar MacConkey (Acumedia, Lansing, USA) e incubação a 37°C por 24 a 48 horas. Para coliformes totais e coliformes a 45°C foi utilizada a técnica do Número Mais Provável (NMP). A contagem e pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada por espalhamento em superfície de ágar Baird-Parker (Merck, Darmstadt, Germany) suplementado com telurito de potássio e gema de ovo e incubação a 37°C por 24 a 48 horas, sendo a confirmação das colônias típicas feita por meio da coloração de Gram e do teste de coagulase.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi feita com pré-enriquecimento em água peptonada tamponada (APT - Acumedia, Baltimore, USA) a 37°C por 18 horas, seguida de enriquecimento seletivo nos caldos tetracionato (TT - Acumedia, Lansing, USA) e selenito cistina (SC - Acumedia, Lansing, USA) a 37°C por 24 horas. O isolamento de *Salmonella* spp. foi realizado em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD - Acumedia, Lansing, USA), ágar Hectoen (HE - Acumedia, Lansing, USA) e ágar bismuto sulfito (BS - Acumedia, Lansing, USA) a 37°C por 24 a 48 horas. As colônias suspeitas foram inoculadas em tubos inclinados de ágar lisina ferro (LIA - Acumedia, Lansing, USA) e ágar tríplice açúcar ferro (TSI - Acumedia, Lansing, USA) que foram incubados por 24 horas a 37°C. Os isolados que apresentaram reações características de *Salmonella* spp. foram submetidos à identificação bioquímica com os testes de produção de indol, fermentação de lactose, fermentação de dulcitol, catalase, fermentação do malonato, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e utilização de citrato. Os isolados que apresentaram resultado característico para *Salmonella* spp. nos testes bioquímicos foram avaliados por teste sorológico, com antisoro H polivalente (Difco, Sparks, USA).

2.3 Análises microbiológicas da polpa de pequi *in natura*, polpa manipulada antes do branqueamento e polpa armazenada após o branqueamento

As amostras de polpa do pequi *in natura* foram retiradas assepticamente em laboratório a partir de frutos coletados na indústria. As amostras de polpa manipulada antes do branqueamento e de polpa armazenada após o branqueamento foram coletadas e transportadas em frascos estéreis. Todas as amostras de polpa foram homogeneizadas em homogeneizador peristáltico por 2 minutos e em seguida foram feitas as contagens de aeróbios mesofílicos, bolores e leveduras, enterobactérias, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais, coliformes a 45°C e pesquisa de *Salmonella* spp.

2.4 Análises microbiológicas de amostras coletadas das mãos dos manipuladores e nas superfícies de manipulação

Foram coletadas amostras das mãos de 12 manipuladores e três amostras de superfícies de manipulação pela técnica do swab descrita pela American Public Health Association (APHA, 1992). Nas mãos, a amostragem correspondeu à superfície da palma e das bordas das mãos, percorrida com swab estéril por três vezes consecutivas. Para amostragem das superfícies de processamento, foi utilizado swab aplicado a um ângulo de 30° de contato com a superfície, percorrendo uma área de 100 cm², por três vezes consecutivas. Após a coleta do material das mãos e das superfícies, cada swab foi quebrado descartando a parte manuseada, colocando-os finalmente em tubos de água peptonada. Nas amostras coletadas nas mãos foi avaliada a presença de *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes a 45°C, enquanto que nas superfícies foi feita a contagem de aeróbios mesofílicos, bolores e leveduras, enterobactérias, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais, coliformes a 45°C e pesquisa de *Salmonella* spp.

2.5 Análises microbiológicas do ambiente e da água utilizada no processamento

A qualidade do ar das áreas de processamento foi avaliada utilizando a técnica de sedimentação simples em placa de Petri descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (APHA, 1992). Foram utilizadas placas com

ágar BDA, ágar TSA e ágar MacConkey, para contagem de bolores e leveduras, aeróbios mesofílicos e enterobactérias, respectivamente. As placas foram distribuídas pela área de processamento e expostas por 15 minutos. Depois de fechadas, as placas foram incubadas a 35°C/24-48 horas para contagem de aeróbios mesofílicos, 25°C/3-5 dias para bolores e leveduras e 37°C/24-48 horas para enterobactérias. Os resultados foram expressos em UFC/cm²/semana. A partir de cada amostra de água coletada dentro da indústria determinou-se o NMP de bactérias do grupo coliformes totais e coliformes a 45°C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela II.1 estão expressos os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras de polpa do pequi *in natura*, polpa recém retirada e polpa armazenada após o branqueamento. Nas amostras da polpa *in natura*, a contagens foram da ordem 10³ UFC/g para bactérias mesófilas aeróbias e para bolores e leveduras. As baixas contagens na polpa *in natura* de enterobactérias, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais e coliformes a 45°C sugerem que estes grupos de microrganismos não fazem parte da microbiota nativa do fruto do pequizeiro.

TABELA II.1 - Análise microbiológica das amostras de polpa de pequi *in natura*, polpa recém retirada e polpa armazenada após o branqueamento

Análise Microbiológica	Polpa <i>in natura</i> <i>log</i> (UFC/g)	Polpa manipulada antes do branqueamento <i>log</i> (UFC/g)	Polpa armazenada após o branqueamento <i>log</i> (UFC/g)
Aeróbios mesofílicos	2,88 UFC /g	5,26 UFC /g	3,92 UFC /g
Bolores e leveduras	3,17 UFC /g	6,64 UFC /g	3,62 UFC /g
Enterobactérias	< 1,00 UFC/g	3,96 UFC /g	2,77 UFC /g
Coliformes totais	< 0,48 NMP/g	> 3,04 NMP/g	1,41 NMP/g
Coliformes a 45°C	< 0,49 NMP/g	1,23 NMP/g	< 0,48 NMP/g
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	< 1,00 UFC/g	< 3,63 UFC/g	< 1,00 UFC/g
<i>Salmonella</i> spp. (Presença/Amostras)	0/3	3/3	1/3

As amostras de polpa recém retiradas apresentaram contagens de aeróbios mesofílicos, bolores e leveduras, enterobactérias e *Staphylococcus* coagulase positiva, em média das ordens de 10^5 , 10^7 , 10^4 e 10^4 UFC/g, respectivamente. Quanto aos coliformes totais e coliformes a 45°C, foram encontradas médias de $> 10^3$ e 10 NMP/g, respectivamente. Em relação à polpa armazenada após o branqueamento, cujo pH variou de 5,2 a 5,8 na solução conservante, as contagens médias destes grupos de microrganismos foram sempre inferiores ao da polpa recém retirada. Foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em todas as amostras de polpa recém retirada e em 1/3 das amostras armazenadas após o branqueamento, porém, nenhuma das amostras da polpa do pequi *in natura* apresentou este microrganismo.

Foi verificada a presença de *Salmonella* spp. em 33% das amostras das mãos dos manipuladores, estando também presente *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes a 45°C na frequência de 83% e 58% das amostras, respectivamente (Tabela II.2).

Nas superfícies de manipulação, a contagem microbiana foi em média de 10^4 UFC/cm² de aeróbios mesofílicos, 10^5 UFC/cm² de bolores e leveduras, 10^4 UFC/cm² de enterobactérias e 10^2 UFC/cm² de *Staphylococcus* coagulase positiva. Foram encontradas também bactérias coliformes nas superfícies (Tabela II.3). Na avaliação do ar ambiental da indústria foram observadas contagens médias de 10^3 , 10^2 e < 10 UFC/cm²/semana para aeróbios mesofílicos, bolores e leveduras e enterobactérias, respectivamente. Demonstrou-se, também, que todas as amostras da água utilizada dentro da indústria estavam contaminadas por coliformes totais e coliformes termotolerantes (Tabela II.2).

TABELA II.2 – Análise microbiológica das amostras coletadas das mãos dos manipuladores

Análise Microbiológica	Amostras Positivas*	(%)
Coliformes a 45°C	7	58,3
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	10	83,3
<i>Salmonella</i> spp.	4	33,3

*Obtidas das mãos de 12 manipuladores.

TABELA II.3 - Análise microbiológica de amostras das superfícies de manipulação, do ambiente e da água utilizada no processamento

Análise Microbiológica	Superfícies de Manipulação <i>log</i> (UFC/cm ²)	Ambiente <i>log</i> (UFC/cm ² /semana)	Água <i>log</i> (NMP/mL)
Aeróbios mesofílicos	4,02	2,77	nd
Bolores e leveduras	4,84	2,15	nd
Enterobactérias	3,6	< 1,00	nd
Coliformes totais	> 3,04	nd	> 3,04
Coliformes a 45°C	1,33	nd	1,55
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	2,2	nd	nd
<i>Salmonella</i> spp. (Presença/Amostras)	3/3	nd	nd

nd: não determinado.

Embora a enumeração de microrganismos aeróbios mesofílicos geralmente não represente um critério de rejeição do produto final, uma contagem alta destes microrganismos nos produtos reflete condições inadequadas da matéria-prima, processamento e armazenamento (ICMSF, 2001). Além disso, uma alta carga microbiana pode mascarar a detecção de patógenos mesofílicos, sendo maior a probabilidade de ocorrência destes microrganismos (FALCÃO et al., 1983). A contagem elevada de bolores e leveduras também é indicativa de condições higiênicas insatisfatórias, podendo comprometer a vida de prateleira do produto final (BRUNO et al., 2005). O crescimento de fungos pode elevar o pH de produtos vegetais ácidos para valores favoráveis ao crescimento de bactérias patogênicas (BRUNO et al., 2005).

A detecção de *Staphylococcus* em alimentos está relacionada com manipulação inadequada durante o processamento (RODRIGUES et al., 2003; BRUNO et al., 2005). As espécies de *Staphylococcus* são os microrganismos contaminantes mais comuns disseminadas por manipuladores de alimentos (APHA, 1992; ANDRADE et al., 2003).

A presença de *Salmonella* spp., por ser potencialmente capaz de provocar infecção alimentar, caracteriza a polpa recém retirada e a polpa armazenada após o branqueamento como impróprias para o consumo. A Legislação Brasileira estabelece

ausência de *Salmonella* spp. em 25g de alimentos (ANVISA, 2001). PINTO et al. (2004) fazem um alerta quanto ao tempo de geração de *Salmonella* spp., que varia de 24 a 34 minutos, podendo atingir números elevados, mesmo que a contaminação inicial tenha sido baixa. No Brasil, foram registrados 192 surtos de doenças de origem alimentar nos anos de 1996 e de 1998 a 2000, com 12.188 enfermos e 3 mortes, sendo a salmonelose responsável pela maioria, com incidência em mais de 75% destas ocorrências (PINHEIRO et al., 2005).

A presença de microrganismos patogênicos nas mãos dos manipuladores e nas superfícies de manipulação é de grande importância para segurança alimentar, devido à possibilidade de transferência dos mesmos para os alimentos (ALMEIDA et al., 1995). Um manipulador de alimentos é capaz de disseminar de 20 a 70 microrganismos por minuto (SALUSTIANO et al., 2003).

A baixa contagem de enterobactérias no ar da área de processamento sugere que estes microrganismos não sobrevivem bem nos aerossóis. Entretanto, esta baixa contagem verificada pode ser explicada pela possibilidade destes microrganismos terem sido afetados pelo meio seletivo utilizado na técnica de contagem, uma vez que os mesmos, segundo a APHA (1992), podem estar estressados nos aerossóis.

Todas as amostras analisadas da água usada na indústria estavam com número elevado de bactérias coliformes totais e coliformes a 45°C. De acordo com a Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), o padrão estabelecido em relação à água para consumo humano é de ausência de coliformes totais e coliformes termotolerantes em 100 mL de amostra. Sabe-se que os coliformes totais são bons indicadores das condições sanitárias dos alimentos, sendo que os coliformes a 45°C são considerados melhores indicadores de contaminação de origem fecal do que os coliformes totais, por serem específicos de fezes humanas e de animais de sangue quente, indicando condições propícias para o aparecimento também de patógenos intestinais (FALCÃO et al., 1983; PINHEIRO et al., 2005). A presença de microrganismos patogênicos na água é decorrente da poluição por fezes humanas e de animais, provenientes de águas residuárias urbanas e rurais (AMARAL et al., 1994).

Na indústria de alimentos, a qualidade da água, a higienização das superfícies e utensílios, a qualidade do ar ambiental, bem como o treinamento dos manipuladores são de fundamental importância para a segurança e a qualidade microbiológica dos produtos finais. Foi verificada deficiência de informações quanto à qualidade da água, a

utilização de cloro e as técnicas de sanitização. A água utilizada não era de rede pública, mas de poço particular. Os poços mantidos de maneira apropriada podem fornecer água de qualidade sanitária adequada, no entanto, são mais susceptíveis à contaminação do que a água de fontes públicas (OPAS, 2001).

A inocuidade das conservas ácidas de polpa de pequi não pode ser garantida apenas pelo seu pH. NGUYEN-THE & CARLIN (1994) relatam a sobrevivência e o crescimento de *Salmonella typhimurium* em sucos de algumas variedades de maçãs, em pH 3,68. BEUCHAT (2002) faz referência à adaptação de microrganismos patogênicos às condições de estresse ambiental, como a sobrevivência em pH muito ácido em alimentos.

A contaminação durante o processamento das conservas de polpa de pequi ocorre principalmente durante a retirada da polpa, quando microrganismos presentes na superfície do fruto *in natura* ou nas mãos dos manipuladores passam para a polpa. FANTUZZI et al. (2004) afirmam que o manuseio em condições inadequadas de higiene, os danos causados nos tecidos vegetais e a higienização inadequada de superfícies e equipamentos contribuem para o aumento da população microbiana nos vegetais.

Os resultados da avaliação das condições higiênico-sanitárias da indústria de processamento de conservas de polpa de pequi alertam para a necessidade de implementação de um sistema de monitoramento microbiológico na área de processamento das conservas de polpa de pequi, incluindo equipamentos, utensílios, superfícies, ar, água e os manipuladores. A implementação de Boas Práticas de Fabricação (BPF) será uma ferramenta fundamental a ser utilizada pela indústria avaliada para garantir a segurança do produto final.

4 CONCLUSÕES

As condições higiênico-sanitárias inadequadas durante o processamento demonstram a não observação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) na indústria avaliada. A ausência de BPF, a presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal na água utilizada na indústria e a presença de microrganismos patogênicos na matéria-prima armazenada podem comprometer a garantia de segurança do produto final, representando um risco a saúde pública.

CAPÍTULO III - ADAPTAÇÃO ÁCIDA DE ENTEROBACTÉRIAS EM CONSERVAS DE POLPA DE PEQUI

RESUMO

Os dados apresentados demonstram a capacidade de adaptação ácida de enterobactérias em conservas acidificadas de polpa de pequi, tendo implicações significativas na sobrevivência de bactérias patogênicas no produto final e conseqüentemente para segurança alimentar. Avaliou-se a tolerância ácida de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* adaptadas (pH 5,5) e não adaptadas (pH 7,0) à acidez, em conservas de polpa de pequi inoculadas e estocadas em temperatura ambiente. Em ambas as espécies microbianas, as células adaptadas à acidez demonstraram significativamente maior tolerância ao baixo pH das conservas quando comparadas a células não adaptadas. Foi discutida a proteção cruzada da habituação ácida contra inativação térmica, presença de ácidos orgânicos e baixa atividade de água. Os resultados mostraram que a adaptação ácida pode ampliar a sobrevivência de enterobactérias em conservas acidificadas de polpa de pequi e, portanto, as condições de armazenamento da matéria-prima antes do processamento podem representar risco à saúde pública.

Palavras-chave: adaptação ácida; conservas de pequi, proteção cruzada.

ABSTRACT

The presented data demonstrate the acid adaptation capacity of enterobacteria in acidified pequi pulp preserves with significant implications in the survival of pathogenic bacteria in the final product and consequently for food safety. The acid tolerance of adapted (pH 5.5) *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* and non-adapted (pH 7.0) cells was evaluated in pequi pulp preserves inoculated and stored in room temperature. For both bacteria, the acid adapted cells were shown better tolerance to the low pH of the preserves when compared to the non-adapted cells. The crossed protection of the acid habituation against the thermal inactivation, presence of organic acids and low water activity was discussed. The results showed that the acid adaptation can enhance the survival of enterobacteria in acidified pequi pulp preserves,

thus the conditions of storage of the raw material before the processing can represent risk to the public health.

Keywords: acid adaptation; cross protection, pequi preserves.

1 INTRODUÇÃO

Durante o processamento de conservas de polpa de pequi, o aumento da acidez é uma das barreiras utilizadas para deter o crescimento de microrganismos, assim como o tratamento térmico, a redução da atividade de água e adição de conservantes. Em algumas indústrias, a polpa de pequi pode ser armazenada por longos períodos em condições de acidez mediana antes de ser acidificada e sofrer tratamento térmico. Este período de estocagem pode promover a indução de mecanismos de tolerância ácida de alguns microrganismos, resultando também em proteção cruzada contra o tratamento térmico e a redução da atividade de água, comprometendo a segurança do produto final.

A aplicação de estresse físico aos microrganismos é largamente utilizada como método de inativação celular e promoção de estabilidade dos alimentos. Para sobreviver, os microrganismos evoluíram mecanismos fisiológicos e genéticos para tolerar condições físicas extremas. Este fato tem grande significância para a indústria de alimentos no que se refere à sobrevivência de organismos deterioradores ou patogênicos no alimento (BEALES, 2004). A sobrevivência de microrganismos patogênicos está limitada a determinadas faixas de temperatura, pH e atividade de água, mas estes podem se adaptar e sobreviver em valores fora daqueles comumente citados nos livros textos (HILL et al., 1995).

Em um dos primeiros estudos sobre adaptação ácida, demonstrou-se que a pré-exposição de *E. coli* a condições de acidez mediana (pH 5,0) confere resistência subsequente à exposição à forte acidez (pH 3,0 a 3,5), sendo este fenômeno denominado de habituação ácida (GOODSON & ROWBURY, 1989). Uma resposta similar foi reportada por FOSTER e HALL (1990) em *S. typhimurium*, que chamaram o processo de tolerância ácida. Assim, os dois termos são usados na literatura para descrever o mesmo fenômeno.

S. typhimurium é um dos sorotipos frequentemente mais envolvido em surtos de intoxicação alimentar (MAÑAS et al., 2001), podendo corresponder até 35% dos isolados humanos reportados (WILMES-RIESENBERG et al., 1996). Esta bactéria ocorre em alimentos e bebidas que foram submetidos a tratamento térmico inadequado ou que sofreram contaminação cruzada após o tratamento térmico (YUSTE & FUNG, 2003). A acidez é uma importante condição ambiental encontrada pela *S. typhimurium* durante sua patogênese (LEE et al., 1994). Esta bactéria possui diferentes sistemas de sobrevivência à acidez induzidos pelo baixo pH (FOSTER & HALL, 1991; LEE et al., 1994; BEARSON et al., 1997; AUDIA et al., 2001). Quando adaptada a acidez, este microrganismo exibe aumento de resistência ao aquecimento e ao sal (LEYER & JOHNSON, 1993). Apesar da sensibilidade à acidez *in vitro*, *S. typhimurium* pode sobreviver ao estresse ácido em diversos nichos ecológicos (FOSTER & HALL, 1990). A resposta de tolerância ácida capacita *S. typhimurium* a sobreviver em ambientes ácidos potencialmente letais (FOSTER & SPECTOR, 1995; BEARSON et al., 1998). Este fenômeno consiste de um complexo sistema de defesa que permite as células sobreviverem em condições tão ácidas quanto em pH 3,0 (PARK et al., 1996).

A pré-exposição de *E. coli* e *S. typhimurium* em condições ácidas ou crescimento em um meio moderadamente ácido, ampliam a sobrevivência em baixo pH (GOODSON & ROWBURY, 1989; FOSTER & HALL, 1991; FOSTER, 1993). LEYER e JOHNSON (1992) também demonstraram que células de *S. typhimurium* expostas brevemente a condições de acidez mediana são significativamente mais resistentes a condições de acidez mais fortes do que células não adaptadas. BEALES (2004) observou que culturas de *S. typhimurium* e *E. coli* são capazes de sobreviver em pH 2,5 por duas horas, um ambiente de pH extremo também encontrado no estômago humano, o que tem implicações significativas para saúde pública. Este sistema induzido de tolerância ácida de *S. typhimurium* já foi descrito em queijo (LEYER & JOHNSON, 1993) e é importante para sua virulência (GARDIA-DEL PORTILLO et al., 1993).

A habituação ácida tem conseqüências importantes para segurança alimentar e para virulência de organismos patogênicos (BROWN et al., 1997). A implicação de alimentos ácidos como veículo de infecção responsável por inúmeros surtos de doenças bacterianas tem forçado uma reconsideração na noção de que alimentos com baixo pH são microbiologicamente seguros (BROWN et al., 1997). A possibilidade de habituação ácida de microrganismos patogênicos durante o processamento de

conservas acidificadas, como as de polpa de pequi, pode comprometer a garantia de segurança do produto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

As amostras de conserva de polpa de pequi analisadas foram adquiridas no comércio da cidade de Montes Claros, região norte do Estado de Minas Gerais. Foram usadas conservas acidificadas de polpa de pequi de 140g (peso drenado). Todas as amostras estavam lacradas, sem estufamento aparente, com a cor característica do produto e dentro do prazo de validade informado pelo fabricante. O pH medido das amostras variou de um mínimo de 3,1 a um máximo de 4,2. As amostras em suas embalagens originais foram previamente esterilizadas em autoclave a 121°C por 15 minutos e armazenadas em temperatura ambiente para posteriormente serem utilizadas no experimento.

2.2 Microrganismos

Foram utilizadas duas culturas padronizadas de bactérias entéricas, *Escherichia coli* (ATCC 8739) e de *Salmonella enterica* subespécie enterica sorovar Typhimurium, depositada como *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). As culturas liofilizadas foram ativadas em tubos de ensaio com caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Sparks, USA) a 37°C por 24 horas. Após a ativação, as culturas foram estriadas em placas de Petri com ágar TSA (Tryptic Soy Agar, Difco, Sparks, USA) e mantidas por 24 horas a 37°C. Os microrganismos crescidos em TSA foram conservados sob refrigeração para utilização posterior no experimento.

2.3 Avaliação de adaptação ácida

Inicialmente as cepas ativadas de *E. coli* e *S. typhimurium* foram crescidas em tubos de ensaio com caldo TSB pH 7,0 por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, as culturas de *E. coli* e *S. typhimurium* foram submetidas a uma acidez mediana pela transferência para tubos com caldo TSB com pH ajustado para pH 5,5 e

incubadas novamente a 37°C por 24 horas. Foram utilizadas como culturas controle, as mesmas cepas-padrão de *E. coli* e *S. typhimurium* crescidas em tubos com caldo TSB pH 7,0 por 24 horas a 37°C, porém sem serem submetidas à acidez. Ao fim do período de incubação, as células das culturas controle de *E. coli* e *S. typhimurium* que cresceram em pH 7,0 foram consideradas não adaptadas à acidez e as células que foram submetidas à acidez mediana e cresceram em pH 5,5 foram consideradas adaptadas à acidez.

As conservas de polpa de pequi esterilizadas foram divididas em dois lotes iguais. Um primeiro lote foi inoculado com as células de *E. coli* e *S. typhimurium* que cresceram em caldo TSB ajustado para pH 5,5 e o segundo com as células que cresceram nos tubos de caldo TSB em pH 7,0. Todas as amostras de conserva inoculadas, com células adaptadas ou não adaptadas, foram armazenadas a temperatura ambiente por um período de uma semana.

Após o período de armazenamento, as conservas de polpa de pequi inoculadas com as células adaptadas e as com células não adaptadas foram submetidas a tratamento térmico por vinte minutos em banho-maria com água em ebulição. As amostras tratadas termicamente foram conservadas a temperatura ambiente por um período de uma semana para possibilitar a possível recuperação de células injuriadas. Finalmente, todas as amostras de conserva de pequi foram avaliadas quanto à recuperação dos microrganismos inoculados.

A recuperação das culturas de *E. coli* e *S. typhimurium* inoculadas nas amostras foi feita pela contagem em placas de ágar TSA incubadas a 37°C por 24 horas pelo método de espalhamento em superfície (APHA, 1992). Foram realizadas contagens em triplicata da polpa e da salmoura das amostras.

2.4 Análise estatística

Os dados das contagens bacterianas foram transformados em logaritmo decimal e avaliados estatisticamente por análise de variância, adotando-se um delineamento fatorial com duas condições (adaptada e não adaptada) e dois tipos de amostra (polpa e salmoura). As contagens com um número de colônias inferior a 30 foram consideradas estimadas (APHA, 1992). Para análise estatística, essas contagens foram consideradas iguais a zero e acrescidas de um, antes da transformação logaritma (LITTLE & HILLS 1972). As médias das contagens

transformadas foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se o nível de proteção $\alpha = 0,05$ (PIMENTEL-GOMES, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A recuperação de *S. typhimurium* e *E. coli* foi significativamente maior nas amostras de conservas de polpa de pequi inoculadas com células adaptadas à acidez, em relação àquelas que foram inoculadas com células não adaptadas, como demonstrado para polpa (Figura III.1) e salmoura (Figura III.2). Esses resultados corroboram os encontrados por diversos autores. Como observaram FOSTER e HALL (1990), a exposição de um microrganismo a condições de acidez moderada pode torná-lo tolerante à acidez, mantendo essa resistência por longos períodos. BERGHOLZ e WHITTAM (2006) demonstraram que a pré-exposição a condições de pH mediano (pH 5,0) pode intensificar a resistência ácida de *E. coli*, sendo o mesmo observado para *Salmonella* por LEYER e JOHNSON (1992). Resposta de tolerância ácida, após exposição a condições ácidas medianas, foi verificada para *S. typhimurium* (FOSTER, 1993; GREENACRE et al., 2003). FOSTER e HALL (1990) determinaram que o pH 5,8 é uma condição mediana de estresse que *S. typhimurium* tolera bem. KWON e RICKE (1998) registraram um aumento de até 138% na sobrevivência de *S. typhimurium* exposta em pH 3, quando as células foram pré-adaptadas em pH 5. SHEN et al. (2007) demonstraram que a adaptação ácida em pH 5,5 podem ampliar a sobrevivência de *S. typhimurium* em derivados de leite fermentados.

O tratamento térmico aplicado às conservas de polpa de pequi, bem como o emprego da salmoura, a acidificação com ácido cítrico e o uso de benzoato de sódio, utilizados no processamento do produto, não impediram o crescimento dos microrganismos testados quando estes foram previamente adaptados à acidez. Já foi demonstrado que a habituação à acidez mediana pode induzir proteção cruzada ao aquecimento e à concentração de sal (FOSTER & HALL, 1990; HALL et al., 1995). LEYER e JOHNSON (1993) demonstraram que células adaptadas de *S. typhimurium* são mais tolerantes termicamente que células não adaptadas. Respostas de tolerância ácida (GREENACRE et al., 2003; BEALES, 2004) e ao estresse salino (GREENACRE & BROCKLEHURST, 2006) podem ser induzidas por ácidos orgânicos, como o ácido benzóico (LEYER et al., 1995).

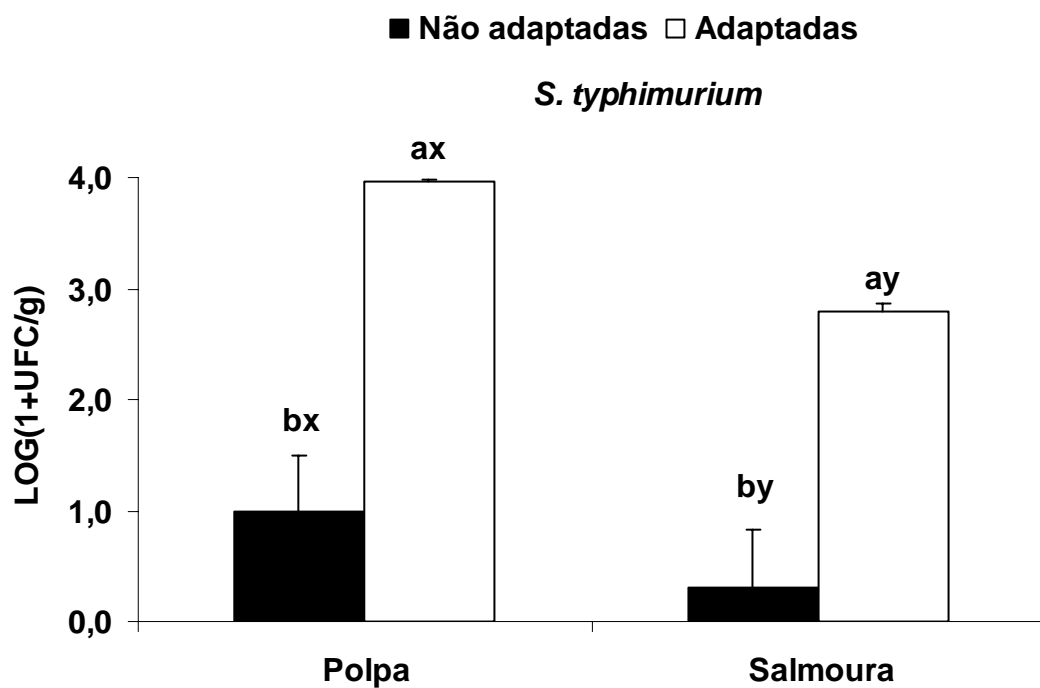


Figura III.1 - Adaptação ácida de *Salmonella typhimurium* em conservas de polpa de pequi.

As médias indicadas com letras diferentes diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, após análise de variância aplicada a esquema fatorial 2x2 (tipo de amostra x condição de adaptação) para delineamento inteiramente casualizado. As letras a, b foram usadas para comparar as contagens nos diferentes tipos de amostra e x, y para comparar a condição de adaptação.

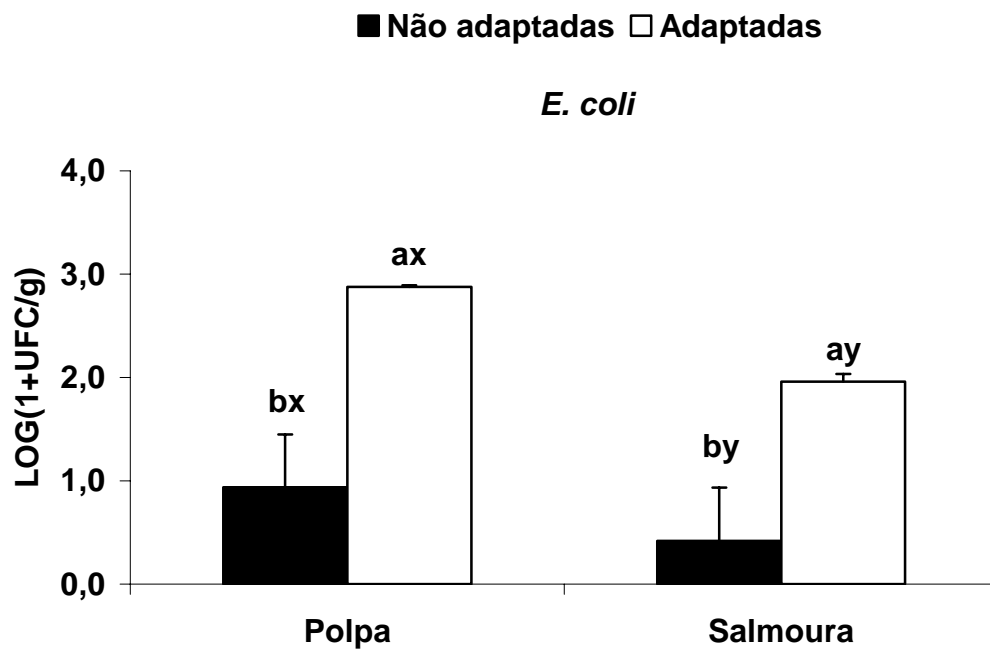


Figura III.2 - Adaptação ácida de *Escherichia coli* em conservas de polpa de pequi.

As médias indicadas com letras diferentes diferiram significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, após análise de variância aplicada a esquema fatorial 2x2 (tipo de amostra x condição de adaptação) para delineamento inteiramente casualizado. As letras a, b foram usadas para comparar as contagens nos diferentes tipos de amostra e x, y para comparar a condição de adaptação.

Maior recuperação de *S. typhimurium* e *E. coli* foi observada na polpa de pequi, quando comparada à salmoura, tanto para células adaptadas quanto para células não adaptadas (Figuras III.1 e III.2). A adesão à superfície de contato do alimento e sua composição podem ter sido fatores determinantes para recuperação significativamente maior observada na polpa em relação à salmoura. Apesar de mostrar que *S. typhimurium* não pode sobreviver em condições ácidas extremas, como pH abaixo de 3, GORDEN e SMALL (1993) verificaram que o alimento pode fornecer um efeito protetor para as bactérias sensíveis à acidez, facilitando sua sobrevivência sob condições ácidas extremas.

Os dados de GAWANDE e BHAGWAT (2002) indicaram que a proteção mediada pelas superfícies de contato é mais forte quando as células crescem sob condições de pH 5,5. Para WATERMAN e SMALL (1998) as células de *Salmonella* sensíveis à acidez podem estar protegidas da morte por ácido (pH 2,5) quando inoculadas na superfície do alimento. A adesão a tecidos pode oferecer também proteção aos microrganismos contra soluções antimicrobianas (STOPFORTH et al., 2004). WATERMAN e SMALL (1998) demonstraram que um inóculo muito pequeno de *S. typhimurium* pode sobreviver à acidez extrema quando presente na superfície de certos alimentos sólidos, fato que pode explicar a baixa dose infectiva em alguns surtos de origem alimentar envolvendo esta bactéria. Esses autores afirmaram ainda que o efeito protetor de alguns alimentos sólidos pode ser o resultado do pequeno aumento do pH no microambiente ocupado pelas bactérias na superfície dos mesmos, o que é consistente com a evidência de que a dose infectiva de alguns patógenos de origem alimentar é menor quando a acidez gástrica é reduzida. Por este motivo, os surtos de origem alimentar caracterizados por baixa dose infectiva estão normalmente associados com o consumo de bactérias em alimentos sólidos, que podem proteger as bactérias dos efeitos letais da acidez estomacal. WATERMAN e SMALL (1998) verificaram, também, que as bactérias podem sobreviver em condições ácidas quando inoculadas na superfície de certos alimentos mesmo que o nível de acidez seja letal para o inóculo em um caldo. Essas observações podem explicar a maior recuperação dos microrganismos observada na polpa de pequi, quando comparada à salmoura.

A polpa de pequi é um alimento com alto teor lipídico (VILELA, 1998; OLIVEIRA et al., 2006) e esta característica pode ser um fator adicional de proteção para microrganismos. JUNEJA e EBLEN (2000) reportaram que alto teor lipídico resulta no aumento da resistência térmica de *S. typhimurium*, informação também divulgada para outros patógenos alimentares (LINE et al. 1991; AHMED et al. 1995). D'AOUST (1985) verificou que a baixa dose infectiva de *Salmonella* em alguns surtos pode estar associada ao alto conteúdo de lipídios do alimento. O efeito protetor sobre as células bacterianas do conteúdo de lipídios dos alimentos sobre o efeito letal do calor é atribuído à redução da atividade de água, uma vez que a sensibilidade ao calor é maior em alimentos com maior atividade de água (JUNEJA & EBLEN, 2000; ALJARALLAH & ADAMS, 2007). MATTICK et al. (2001) relataram para *Salmonella* uma proteção em temperaturas acima de 70°C promovida pela redução da atividade de água.

As condições de pré-processamento da matéria-prima podem favorecer a transmissão de microrganismos patogênicos. Como demonstrado no Capítulo II, a polpa de pequi em uma indústria de conservas estava armazenada em condições de pH mediano (5,2 a 5,8) antes do processamento, tendo sido identificada a presença de *Salmonella* e de microrganismos indicadores de contaminação fecal. Estas observações, aliadas à demonstração da habituação ácida dos microrganismos nas conservas de pequi representam um fator de risco à saúde pública.

4 CONCLUSÕES

Quando adaptadas previamente em acidez mediana (pH 5,5), *E. coli* e *S. typhimurium* pode sobreviver em conservas acidificadas de polpa de pequi após tratamento térmico. Esta adaptação pode ser um fator de risco para os consumidores uma vez que algumas indústrias de conserva de pequi armazenam a matéria-prima em condições de pH mediano antes do processamento do produto final.

CAPÍTULO IV - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS EM POLPA DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.) COM POTENCIAL PARA ATUAREM COMO AGENTES DE BIOCONTROLE

RESUMO

Polpa de pequi foi usada para o isolamento e identificação de bactérias lácticas e leveduras. Foram identificados vinte e cinco isolados de leveduras utilizando o sistema API 20 C AUX, com dez destes também sendo identificados pelo sistema VITEK YBC. O sistema API 20 C AUX identificou leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, sendo a espécie de ocorrência mais freqüente *Candida krusei* (48% dos isolados). Foram identificados pelo sistema VITEK YBC leveduras dos gêneros *Candida* e *Yarrowia*, com maior ocorrência da espécie *Candida krusei* (mais de 30% dos isolados). Foi verificada uma correspondência de 70% entre os sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC. Dez isolados de bactérias lácticas foram identificados com o sistema API 50 CHL, que identificou apenas o gênero *Lactobacillus*, sendo a espécie mais freqüente *Lactobacillus plantarum* (40% dos isolados).

Palavras-chave: API 20 C AUX; API 50 CHL; bactérias lácticas; bioconservação; leveduras; pequi; VITEK YBC.

ABSTRACT

Lactic bacteria and yeasts were isolated from pulp of pequi, a typical Brazilian fruit. Twenty-five isolates of yeast were identified by biochemical tests, using the API 20 C AUX system and ten of them were also identified by the VITEK YBC system. The API 20 C AUX system identified yeasts such as *Candida* and *Cryptococcus*, with predominance of *Candida krusei* (48% of the isolates). *Candida* and *Yarrowia* were the yeasts identified by the VITEK YBC system with more than 30% of the isolates been of *Candida krusei*. An agreement of 70% between the API 20 C AUX and VITEK YBC systems was verified. Ten isolated of *Lactobacillus* were identified by the API 50 CHL system, being *Lactobacillus plantarum* the most frequent specie (40% of the isolates).

Keywords: API 20 C AUX ; API 50 CHL; biopreservation; lactic bacteria ; pequi; VITEK YBC; yeast.

1 INTRODUÇÃO

O pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma espécie de grande relevância na região de cerrado do norte do Estado de Minas Gerais (ARAÚJO, 1995) e o extrativismo de seu fruto, o pequi, é utilizado pelas populações desta região para a alimentação e a melhoria de renda, a partir da venda direta do fruto *in natura* ou da industrialização de produtos derivados (DOMBROSKI, 1997; MELO JÚNIOR et al., 2004). O pequi sofre um rápido processo de deterioração o que provoca uma perda significativa da produção na zona rural dos municípios dessa região por falta de condições de transporte e armazenamento. O alto custo financeiro da energia elétrica e sua indisponibilidade em muitas localidades inviabilizam a conservação caseira do pequi pelo uso de formas tradicionais de conservação de alimentos, como o congelamento. Mesmo para indústrias processadoras de derivados de pequi da região, o custo de processamento é muito alto, considerando os gastos com energia e aditivos químicos, resultando em um produto final de alto valor agregado, geralmente incompatível com o nível de renda das populações locais.

Uma das alternativas para conservação do pequi de baixo custo tem sido historicamente a elaboração de conservas, que não exige instalações e equipamentos complexos, sendo utilizados processos muitas vezes artesanais (ALMEIDA et al., 1987). Muitas receitas caseiras de conservas têm sido utilizadas pela população e por entidades públicas de assistência técnica, entre estas podem ser citadas a conservação em salmoura, óleo, cachaça ou vinagre. Entretanto, processamentos inadequados, decorrentes da carência de dados científicos sobre a conservação do pequi, aliados a não observância das Boas Práticas de Fabricação (BPF), podem originar produtos de baixa qualidade sanitária, com conseqüências danosas para os consumidores. A bioconservação utilizando microrganismos nativos do pequi pode ser uma opção de baixo custo para conservação deste produto, com relevância para o aspecto de garantia de segurança microbiológica.

O isolamento e a identificação de microrganismos a partir de fontes naturais tem sido uma poderosa ferramenta para se obter estirpes úteis e geneticamente estáveis, sendo as bactérias do ácido láctico especialmente importantes por atuarem como conservantes naturais (ADNAN & TAN, 2007). Quanto às leveduras, podem ter um impacto significativo nos parâmetros de qualidade do alimento, quando presentes isoladamente ou em populações mistas estáveis, em conjunto com bactérias lácticas (AIDOO et al., 2006). Bactérias lácticas e leveduras isoladas e identificadas no pequi *in natura* poderão ser utilizadas pela população e pelas indústrias como bioconservadores em produtos derivados, permitindo o armazenamento durante a entressafra e conseqüentemente a manutenção de uma fonte de alimentação e renda.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

O material analisado foi constituído de amostras do fruto do pequi *in natura* coletados no período da safra 2006-2007 no município de Japonvar na região norte do estado de Minas Gerais. Os frutos foram despolidos, sendo a polpa obtida misturada em uma única amostra. Esta amostra, acondicionada em frascos estéreis, foi transportada para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, no qual foi realizado o isolamento e a identificação de bactérias lácticas e leveduras.

2.2 Isolamento e identificação de Bactérias lácticas e leveduras

A partir da polpa do pequi *in natura* homogeneizada em água peptonada foram isoladas culturas de bactérias lácticas e leveduras. As bactérias lácticas foram isoladas por estriamento em superfície de placas de ágar MRS (Oxoid, Basingstoke, UK) incubadas a 37°C por 48-72 horas em atmosfera microaerófila utilizando o sistema Anaerobac® (Probac, São Paulo, Brasil). Após a incubação, foram isoladas as colônias que apresentaram coloração de Gram positiva e teste de catalase negativo.

Entre as colônias isoladas, dez foram selecionadas para serem identificadas as espécies, com base em suas características bioquímicas, usando o sistema API 50 CHL (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), sendo os testes feitos de acordo com as instruções do fabricante.

As culturas de leveduras foram isoladas por estriamento em placas de ágar extrato de malte (Oxoid, Basingstoke, UK) incubadas a 25°C por 3-5 dias. Após este período, as colônias isoladas foram conservadas sob refrigeração em tubos inclinados contendo o mesmo meio.

Vinte e cinco isolados foram selecionados para a identificação pelo sistema API 20 C AUX (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), sendo que dez destes também foram identificados pelo sistema VITEK YBC (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Nos dois sistemas os testes foram feitos de acordo com as instruções do fabricante. A identificação pelo sistema VITEK YBC foi feito pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) de Belo Horizonte-MG.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil de identificação de dez isolados de bactérias lácticas pelo sistema API 50 CHL é apresentado na Tabela IV.1, constando a frequência de ocorrência e a porcentagem de identidade de cada espécie identificada. Foi identificado somente o gênero *Lactobacillus*, com identidade que variou de 68,1% a 99,9%. A espécie *Lactobacillus plantarum* foi identificada com maior frequência (40%), com identidade variando de 77,5% a 99,9%. Três isolados (30%) não puderam ser identificados pelo sistema utilizado.

O gênero *Lactobacillus* tem sido proposto como uma alternativa ao uso de culturas bioconservadoras (ANDERSEN, 1995; BREDHOLT et al., 2001; DEVLIEGHIERE et al., 2003). BERNBOM et al. (2006) demonstraram o potencial da espécie *Lactobacillus plantarum*, identificada neste trabalho, como cultura bioconservadora. Esta espécie teve atividade inibitória contra *Listeria innocua* (TODOROV et al., 2007), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis* (MANTE et al., 2003), *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* O157:H7 (VALENZUELA et al., 2007). DAL BELLO et al. (2007) confirmaram o potencial de *L. plantarum* na melhoria da vida de prateleira de pão de trigo, uma vez que esta espécie mostrou atividade contra bolores deterioradores. Comprovou-se que

esta espécie de bactéria láctica tem efeito fungistático sobre fungos do gênero *Fusarium* (LAITILA et al., 2002) e capacidade de inibir bactérias do gênero *Bacillus* (KATINA et al., 2002). Também já foi evidenciado o potencial de *L. plantarum* como agente de controle biológico contra *Listeria monocytogenes* (WILSON et al., 2005).

Tabela IV.1 - Identificação de dez isolados de bactérias lácticas de polpa de pequi *in natura* através do sistema API 50 CHL

Amostra	Espécie Identificada	*% ID
08	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
04	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99,9
06	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99,5
01	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	85,8
10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	79,1
09	<i>Lactobacillus plantarum</i>	77,5
05	<i>Lactobacillus brevis</i>	68,1
02	Não Identificado	-
03	Não Identificado	-
07	Não identificado	-

* %ID - Porcentagem de Identidade.

A espécie *Lactobacillus fermentum*, também identificada na polpa de pequi, já teve sua atividade antagonista verificada contra patógenos como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella sonnei* e *Staphylococcus aureus* (LIN et al., 2007).

Outra espécie identificada foi *Lactobacillus acidophilus*, que segundo CHIODA et al. (2007) pode inibir o crescimento de *E. coli*, um efeito inibitório também demonstrado por OGAWA et al. (2001). *Lactobacillus acidophilus* é considerado um microrganismo com potencial probiótico (KAILASAPATHY & CHIN, 2000), com habilidade de produzir compostos antimicrobianos e de promover atividade antagonista contra patógenos, tendo alto potencial de aplicação na conservação de alimentos (CHIODA et al., 2007). Segundo FLEET (2007), os probióticos são microrganismos viáveis benéficos para os consumidores quando ingeridos em quantidades apropriadas. As espécies *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. brevis* também demonstraram bom potencial probiótico (KLINGBERG et al., 2005; OLIVARES et al., 2006).

Embora certas espécies de bactérias lácticas sejam proeminentes como organismos probióticos, existe um aumento do interesse nas leveduras como probióticos (SULLIVAN & NORD, 2003; VAN DER AA KUHLE et al., 2005; PSANI & KOTZEKIDOU, 2006; FLEET, 2007). O efeito de probióticos sobre a inibição de patógenos é de grande relevância, e a utilização de bactérias lácticas como bioconservadores mostra-se como uma alternativa promissora para conservação de produtos alimentares (LIM et al., 1993; REID & BURTON, 2002).

Vinte e cinco isolados de leveduras de polpa de pequi *in natura* foram identificados pelo sistema API 20 C AUX. Está apresentado na Figura IV.1 o perfil de identificação dos isolados, demonstrando as espécies identificadas e suas respectivas freqüências de ocorrência. A espécie mais freqüente foi *Candida krusei*, representando 48% dos isolados e nível de identidade que variou de 93,9% a 98,9%.

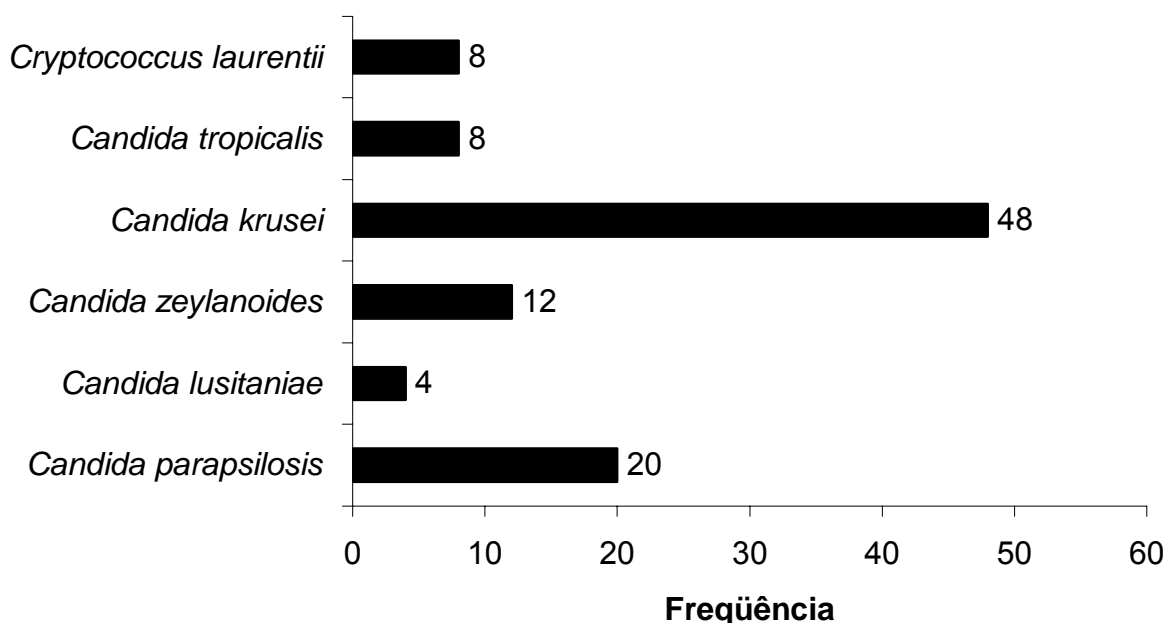


Figura IV.1 - Perfil de identificação de leveduras pelo sistema API 20 C AUX.

Dos vinte e cinco isolados identificados pelo sistema API 20 C AUX, dez também foram identificados pelo sistema VITEK YBC. Este sistema identificou leveduras dos gêneros *Candida* e *Yarrowia*, sendo a espécie mais freqüente *C. krusei*, representando mais de 30% dos isolados identificados e identidade de 94%. Demonstra-se na Tabela IV.2 uma comparação dos resultados obtidos pelos sistemas VITEK YBC e API 20 C AUX. Foi verificada uma boa correspondência entre os resultados obtidos, reforçando a identificação dos isolados. Em uma comparação entre os sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC, FENN et al. (1994) afirmaram que é favorável a comparação entre estes na identificação de leveduras das espécies *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitaniae*, *Candida zeylanoides* e *Cryptococcus laurentii*. WADLIN et al. (1999) não obtiveram resultados significativamente diferentes entre os sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC, na identificação de várias espécies de leveduras, entre estas *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. lusitaniae*. AUBERTINE et al. (2006) também verificaram correlação entre os sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC.

Tabela IV.2 - Comparação da identificação de dez isolados de leveduras de polpa de pequi *in natura* pelos sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC

Amostra	API 20 C AUX (*% ID)	VITEK YBC (*% ID)
06	<i>Candida lusitaniae</i> (99,9%)	<i>Candida lusitaniae</i> (99%)
04	<i>Candida parapsilosis</i> (99,9%)	<i>Candida parapsilosis</i> (80%)
23	<i>Candida parapsilosis</i> (99,6%)	<i>Candida parapsilosis</i> (91%)
01	<i>Candida krusei</i> (98,9%)	<i>Candida krusei</i> (94%)
19	<i>Candida krusei</i> (98,9%)	<i>Candida krusei</i> (94%)
12	<i>Candida krusei</i> (98,9%)	<i>Candida krusei</i> (94%)
24	<i>Candida tropicalis</i> (95,7%)	<i>Candida tropicalis</i> (99%)
11	<i>Candida krusei</i> (98,9%)	<i>Yarrowia lipolytica</i> (99%)
18	<i>Candida zeylanoides</i> (99,9%)	Não identificado
15	<i>Cryptococcus laurentii</i> (94,1%)	Não identificado

* %ID - Porcentagem de Identidade.

Analisando polpa de frutas tropicais, entre estas algumas que ocorrem em região de cerrado como mangaba e umbu, TRINDADE et al. (2002) também identificaram leveduras das espécies *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. laurentii*. O gênero *Candida* já foi demonstrado por vários autores como uma possibilidade de aplicação como microrganismos bioconservadores (ROSINI, 1985; McGUIRE, 1994; ROSINI & CANTINI, 1987; JANISIEWICZ & KORSTEN, 2002; FRAVEL, 2005). Do gênero *Cryptococcus* algumas espécies apresentam potencial como culturas bioconservadoras (JANISIEWICZ & KORSTEN, 2002; FRAVEL, 2005). Alguns autores demonstraram que a espécie *C. laurentii*, identificada na polpa de pequi, apresenta potencial para atuarem como agentes de bioconservação (YU & ZHENG, 2006; YU et al., 2007; YU & ZHENG, 2007).

A polpa de pequi *in natura* apresenta uma microbiota variada de leveduras e bactérias lácticas. Algumas espécies identificadas têm potencial bioconservativo já demonstrado (FRAVEL, 2005; LIN et al., 2007; TODOROV et al., 2007; YU & ZHENG, 2007), podendo possivelmente também ser aplicado à conservação de produtos derivados do pequi. A utilização de espécies bioconservadoras nativas do pequi pode representar uma alternativa na conservação deste produto durante a entressafra, possibilitando um menor custo financeiro, a manutenção de uma importante fonte de renda e emprego, além da garantia de segurança microbiológica.

4 CONCLUSÕES

Foram identificadas quatro espécies de bactérias lácticas, todas do gênero *Lactobacillus*, sendo a espécie de maior ocorrência *Lactobacillus plantarum*, representando 40% dos isolados, com porcentagem de identidade variando de 77,5% a 99,9%. Seis espécies de leveduras foram identificadas pelo sistema API 20 C AUX, com *Candida krusei* representando a espécie de maior frequência (48% dos isolados). Na comparação entre os sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC, dos dez isolados comparados, sete tiveram resultados similares nos dois sistemas, dois não foram identificados pelo sistema VITEK YBC e um teve resultado divergente. Portanto, os dois sistemas de identificação de leveduras tiveram uma boa correspondência.

CONCLUSÕES INTEGRADAS

De trinta amostras analisadas de três marcas comerciais diferentes de conservas de polpa de pequi, mais de 30% foram consideradas impróprias para o consumo devida a presença de *Salmonella* spp.

Foram verificadas baixas contagens de enterobactérias e bactérias coliformes nas conservas, porém a presença de *Salmonella* spp. em um número significativo de amostras sugeriu a presença de microrganismos injuriados, o que foi comprovado para duas marcas avaliadas.

As contagens de aeróbios mesofílicos e de bolores e leveduras sugeriram que, das três marcas, duas foram processadas em condições higiênico-sanitárias inadequadas, comprometendo a segurança do produto.

As condições inadequadas de processamento das conservas de polpa de pequi foram confirmadas para uma das marcas analisadas. Na avaliação da indústria processadora foi comprovada a ausência de Boas Práticas de Fabricação, presença de microrganismos indicadores de contaminação fecal na água utilizada na indústria e a presença de microrganismos patogênicos na matéria-prima armazenada, afetando a qualidade do produto final e representando risco à saúde pública.

Foi demonstrado que o armazenamento da matéria-prima na indústria em pH pouco ácido por longos períodos, representa risco à segurança do produto final. Verificou-se que microrganismos como *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, quando adaptados previamente em baixa acidez (pH 5,5), podem sobreviver em conservas acidificadas (pH 3,0 - 4,0) de polpa de pequi após tratamento térmico.

Foram isoladas da polpa de pequi *in natura* bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* e leveduras dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, microrganismos que já tiveram seu potencial na bioconservação de alimentos comprovados por vários autores. Os sistemas API 20 C AUX e VITEK YBC para identificação de leveduras apresentaram uma correspondência de 70%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conclusões desta tese apontam para a necessidade de pesquisas voltadas para a melhoria da qualidade microbiológica na conservação do pequi e seus produtos derivados. Além disso, a diminuição dos custos de conservação para o maior aproveitamento da produção na entressafra é demandada. Sendo assim, sugerimos estudos futuros sobre a bioconservação com a utilização de bactérias lácticas e leveduras para atender a esta demanda.

Após a identificação dos agentes de biocontrole nativos do pequi, estes poderiam ser avaliados quanto ao potencial para atuarem na conservação do produto. Simulações de várias situações de dinâmica de comunidades poderiam ser aplicadas. Predatismo, competição, inibição e mutualismo poderiam ser situações simuladas, objetivando obter informações que possam levar a um biocontrole efetivo nas conservas de pequi em salmoura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C. Bacteriocins: Modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*, v. 28, p. 169-185, 1995.
- ABEE, T.; WOUTERS, J.A. Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology*, v. 50, p. 65-91, 1999.
- ABDUL-RAOUF, U.M.; BEUCHAT, L.R.; AMMAR M.S. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 2364-2368, 1993.
- ADAMS, M.R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*, v. 8, p. 227-239, 1997.
- ADNAN, A.F.M.; TAN, I.K.P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1380-1385, 2007.
- AHMED, M.N.; CONNER, D.E.; HUFFMAN, D.L. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition. *Journal of Food Science*, v. 60, p. 606-610, 1995.
- AIDOO, K.E.; NOUT, M.J.R.; SARKAR, P.K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 30-39, 2006.
- ALDSWORTH, T. G.; SHARMAN, R. L.; DODD, C. E. R.; STEWART, G. S. A. B. A Competitive Microflora Increases the Resistance of *Salmonella typhimurium* to Inimical Processes: Evidence for a Suicide Response. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 1323-1327, 1998.
- ALDSWORTH, T. G.; SHARMAN, R. L.; DODD, C. E. R. Bacterial suicide through stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 56, p. 378-383, 1999.

- ALJARALLAH, K.M.; ADAMS, M.R. Mechanisms of heat inactivation in *Salmonella* serotype *Typhimurium* as affected by low water activity at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 153-160, 2007.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A; RIBEIRO, J. F. Aproveitamento Alimentar de Espécies Nativas dos Cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1987. 83 p.
- ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. Pequi e Buriti: Importância alimentar a população dos cerrados. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38 p.
- ALMEIDA, R. C. C.; KUAYE, A. Y.; SERRANO, A. M.; ALMEIDA, P. F. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. *Revista de Saúde Pública*, v. 29, p. 290-294, 1995.
- ALMEIDA, S.P. Frutas nativas do Cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 556 p.
- ALMEIDA, S.P., PROENÇA, C.E.B., SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- AL-ZOREKY, N.; AYRES, J.W.; SANDINE, W.E. Antimicrobial activity of Microgard against food spoilage and pathogenic microorganisms. *Journal Dairy Science*, v. 74, p. 758-763, 1991.
- AMARAL, L. A.; JÚNIOR, O. D. R.; FILHO, A. N.; ALEXANDRE, A. V. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária da água de poços rasos localizados em uma área urbana: utilização de colifagos em comparação com indicadores bacterianos de poluição fecal. *Revista de Saúde Pública*, v. 28, p. 345-348, 1994.
- AMMOR, S. ; TAUVERON, G. ; DUFOUR, E. ; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility, 1 - Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, v. 17, p. 454-461, 2006a.

- AMMOR, S. ; TAUVERON, G. ; DUFOUR, E. ; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility, 2 - Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. *Food Control*, v. 17, p. 462-468. 2006b.
- APHA (American Public Health Association). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association, 1992. 1219 p.
- ANDERSEN, L. Biopreservation with FloraCarn L-2. *Fleischwirtschaft*, v. 75, p. 711-712, 1995.
- ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M.; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. *Ciência Agrônômica*, v. 27, p. 590-596, 2003.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução – RDC n. 12, 2 de janeiro de 2001. Estabelece padrões microbiológicos de alimentos. Diário Oficial, Brasília, 10 jan. 2001, p. 45-53.
- ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable of central Brazilian Cerrados. *Economic Botany*, v. 1, p. 40-48, 1995.
- ARCHER, D.L. Preservation microbiology and safety: Evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. *Trends in Food Science & Technology*, v. 7, p. 91-95, 1996.
- ARNOLD, K.W.; KASPAR, C.W. Starvation- and stationary-phase-induced acid tolerance in *Escherichia coli* 0157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 61, p. 2037-2039, 1995.

- AROCHA, M.M.; McVEY, M.; LODER, S.D.; RUPNOW, J.H.; BULLERMAN, L.B. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O167:H7 during the manufacture of cottage cheese. *Journal of Food Protection*, v. 55, p. 379-381, 1992.
- ASSELT, E. D. V.; ZWIETERING, M.H. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, v. 107, p. 73-82, 2006.
- AUBERTINE, C. L.; RIVERA, M.; ROHAN, S. M.; LARONE, D. H. Comparative Study of the New Colorimetric VITEK YBC 2 Yeast Identification Card versus the Older Fluorometric Card and of CHROMagar *Candida* as a Source Medium with the New Card. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, p. 227-228, 2006.
- AUDIA, J.P.; WEBB, C.C.; FOSTER, J.W. Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 291, p. 97-106, 2001.
- BAIK, H.S.; BEARSON, S.; DUNBAR, S.; FOSTER, J.W. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. *Microbiology*, v. 142, p. 3195-3200, 1996.
- BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER, J.W. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v. 147, p. 173-180, 1997.
- BEARSON, B.L.; WILSON, L.; FOSTER, J.W. A Low pH-Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects *Salmonella typhimurium* against Inorganic Acid Stress. *Journal of Bacteriology*, v. 180, p. 2409-2417, 1998.
- BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 3, p. 1-20, 2004.
- BENJAMIN, M. M.; A. R. DATTA. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 1669-1672, 1995.

- BERGHOLZ, T.M.; WHITTAM, T.S. Variation in acid resistance among enterohemorrhagic *Escherichia coli* in a simulated gastric environment. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 1-11, 2006.
- BERNBOM, N.; LICHT, T.R.; SAADBYE, P.; VOGENSEN, F.K.; NØRRUNG, B. *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* in an in vitro continuous flow gut model, but promotes invasion of *L. monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats. *International Journal of Food Microbiology*, v. 108, p. 10-14, 2006.
- BEUCHAT, L.R. Pathogenic microorganisms associated with fresh produce. *Journal of Food Protection*, v. 59, p. 204-216, 1995.
- BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 413-423, 2002.
- BLACKBURN, C.D.; CURTIS, L.M.; HUMPHESON, L.; BILLON, C.; McCLURE, P.J. Development of thermal inactivation models for *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal of Food Microbiology*, v. 38, p. 31-44, 1997.
- BOOTH, I.R.; CASH, P.; O'BYRNE, C. Sensing and adapting to acid stress. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, p. 33-42, 2002.
- BOWER, C.K.; DAESCHEL, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*, v. 50, p. 33-44, 1999.
- BRACKETT, R.E.; HAO, Y.Y.; DOYLE, M.P. Ineffectiveness of hot acid sprays to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Journal of Food Protection*, v. 57, p. 198-203, 1994.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 1469 de 29 de dezembro de 2000. Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial, Brasília, 2 janeiro de 2001, p. 39.

- BREDHOLT, S.; NESBAKKEN, T.; HOLCK, A. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *International Journal of Food Microbiology*, v. 66, p. 191-196, 2001.
- BROWN, J.L.; ROSS, T.; McMEEKIN, T.A.; NICHOLS, P.D. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, v. 37, p. 163-173, 1997.
- BRUNO, L. M.; QUEIROZ, A. A. M.; ANDRADE, A. P. C.; VASCONCELOS, N. M.; BORGES, M. F. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza (CE). *Boletim CEPPA*, v. 23, p. 75-84, 2005.
- BUCHANAN, R.L.; EDELSON, S.G. Effect of pH-dependent stationary phase acid resistance on the thermal tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, v. 16, p. 447-458, 1999.
- CALVO, J.; CALVENTE, V.; ORELLANO, M.E.; BENUZZI, D.; TOSETTI, M.I.S. Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 113, p. 251-257, 2007.
- CASADEI, M.A.; INGRAM, R.; HITCHINGS, E.; ARCHER, J.; GAZE, J.E. Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology*, v. 63, p. 125-134, 2001.
- CASEY, P.G.; CONDON, S. Sodium chloride decreases the bactericidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, p. 199-206, 2002.

- CEASAMINAS. CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DE MINAS GERAIS. Acompanhamento da oferta de produtos por estado do país – Minas Gerais, de janeiro/2005 a fevereiro/2006. 2006.
- CHENG, C.M.; KASPAR, C.W. Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, v. 15, p. 157-166, 1998.
- CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, v. 37, p. 583-585, 2007.
- CHUNG, H.J.; BANG, W.; DRAKE, M.A. Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 5, p. 52-64, 2006.
- CIANI, M.; FATICHENTI, F. Killer Toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a Biopreservative Agent To Control Apiculate Wine Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 3058-3063, 2001.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 71, p. 1-20, 2001.
- CONNER, D. E.; J. S. KOTROLA. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Applied Environmental Microbiology*, v. 61, p. 382-385. 1995.
- CONTER, M.; MUSCARIELLO, T.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; VERGARA, A.; CAMPANINI, G.; IANIERI, A. Characterization of lactic acid bacteria Isolated from an italian dry fermented Sausage. *Annali Della Facolta di Medicina Veterinaria di Parma*, v. 25, p.167-174, 2005.

- COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; TORRES, R.; VINAS, I. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 873-878, 2002.
- CUNHA, V. A.; BASTOS, M. S. R.; FEITOSA, T.; OLIVEIRA, M. E. B.; MUNIZ, C. R. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias dos equipamentos utilizados em três fábricas de polpa de fruta congelada da região metropolitana de Fortaleza. *Boletim CEPPA*, v. 18, p. 171-176, 2000.
- DAL BELLO, F.; CLARKE, C.I.; RYANA, L.A.M.; ULMERA, H.; SCHOBBERA, T.J.; STRÖMC, K.; SJÖGREND, J.; VAN SINDERENB, D.; SCHNÜRERC, J.; ARENDT, E.K. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*, v. 45, p. 309-318, 2007.
- D'AOUST, J.Y. Infective dose of *Salmonella typhimurium* in cheddar cheese. *American Journal of Epidemiology*, v. 122, p. 717-719, 1985.
- DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New Preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, v. 14, p. 273-285, 2003.
- DHIR, V.K.; DODD, C.E.R. Susceptibility of suspended and surface-attached *Salmonella* Enteritidis to biocides and elevated temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 1731-1738, 1995.
- DODD, C.E.R; RICHARDS, P.J.; ALDSWORTH, T.G. Suicide through stress: A bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. *International Journal of Food Microbiology* (2007), doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.008.
- DODD, C.E.R; ALDSWORTH, T.G. The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, p. 189-194, 2002.

- DOMBROSKI, J. L. D. Estudos sobre a propagação do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). Lavras: Departamento de Biologia da UFLA. 1997. 78 p. (Dissertação, Mestrado em Fisiologia Vegetal).
- DOYLE, M.E.; MAZZOTTA, A.S. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. *Journal of Food Protection*, v. 63, p. 779-795, 2000.
- DROBY, S.; COHEN, L.; DAUS, A.; WEISS, B.; HOREV, B.; CHALUTZ, E.; KATZ, H.; KEREN-TZUR, M.; SHACHNAI, A. Commercial Testing of Aspire: A Yeast Preparation for the Biological Control of Postharvest Decay of Citrus. *Biological Control*, v. 12, p. 97-101, 1998.
- DROBY, S.; WISNIEWSKI, M.; EL GHAOUTH, A.; WILSON, C. Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biology and Technology*, v. 27, p. 127-135, 2003.
- DUFFY, G.; ELLISON, A.; ANDERSON, W.; COLE, M.B.; STEWART, G.S.A.B. Use of bioluminescence to model the thermal inactivation of *Salmonella Typhimurium* in the presence of a competitive microflora. *Applied Environmental Microbiology*, v. 61, p. 3463-3465, 1995.
- EL-ZAATARI, M.; PASARELL, L.; MCGINNIS, M.R.; BUCKNER, J.; LAND, G.A.; SALKIN, I.F. Evaluation of the Updated Vitek Yeast Identification Data Base. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 1938-1941, 1990.
- ENCINAS, J.P.; LÓPEZ-DÍAZ, T.M.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L.; OTERO, A.; MORENO, B. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science*, v. 54, p. 203-208, 2000.
- FALCÃO, D. P.; FILHO, G. B.; NISHIDA, N. K.; BORGES, S. R. Exame microbiológico de sorvetes não pasteurizados. *Revista de Saúde Pública*, v. 17, p. 2-8, 1983.

- FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M. C. D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 207-211, 2004.
- FARBER, J.M.; PAGOTTO, F. The effect of acid shock on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 15, p. 197-201, 1992.
- FENN, J.P.; SEGAL, H.; BARLAND, B.; DENTON, D.; WHISENANT, J.; CHUN, H.; CHRISTOFFERSON, K.; HAMILTON, L.; CARROLL, K. Comparison of updated VITEK Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, p. 1184-1187, 1994.
- FERREIRA, F.R.; BIANCO, S.; DURIGAN, J.F.; BELINGIERI, P.A.; Caracterização física e química de frutos maduros de pequi. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, 1987, Campinas. Anais... Campinas: SBF, 1987. p. 643-646.
- FLEET, G.H. Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 12, p. 1-44, 1992.
- FLEET, G.H. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, v. 50, p. 101-117, 1999.
- FLEET, G.H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 170-175, 2007.
- FLETCHER, S.A.; CSONKA, L.N. Characterization of the induction of increased thermotolerance by high osmolarity in *Salmonella*. *Food Microbiology*, v. 15, p. 307-317, 1998.
- FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, v. 172, p. 771-778, 1990.
- FOSTER, J.W. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 6896-6902, 1991.

- FOSTER, J.W.; HALL, H.K. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 5129-5135, 1991.
- FOSTER, J.W. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *Journal of Bacteriology*, v. 175, p. 1981-1987, 1993.
- FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. How *Salmonella* survives against the odds. *Annual Review of Microbiology*, v. 49, p. 145-174, 1995.
- FOSTER, J.W. Acid stress response of *Salmonella* and *E. coli*: survival mechanisms, regulation, and implications for pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, v. 39, p. 89-94, 2001.
- FRANCO, G. Nutrição: texto básico e tabela de composição química dos alimentos. Rio de Janeiro: Atheneu, 1982. 230 p.
- FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Plant Biology*, v. 43, p. 337-359, 2005.
- GAHAN, C.C.M.; HILL, C. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 50, p. 93-100, 1999.
- GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; HOUSTON, A.K.; JOLY, S.; SULLIVAN, D.J.; COLEMAN, D.C.; SOLL, D.R. Identification of *Candida dubliniensis* Based on Temperature and Utilization of Xylose and α -Methyl-D-Glucoside as Determined with the API 20C AUX and Vitek YBC Systems. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 3804-3808, 1999.
- GARDIA-DEL PORTILLO, F.; FOSTER, J. W.; FINLAY, B. B. Role of acid tolerance response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 4489-4492, 1993.

- GARREN, D.M.; HARRISON, M.A.; RUSSELL, S.M. Acid tolerance and acid shock responses of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates provide cross protection to sodium lactate and sodium chloride. *Journal of Food Protection*, v. 61, p. 158-161, 1998.
- GAWANDE, P.V.; BHAGWAT, A.A. Inoculation onto solid surfaces protects *Salmonella* spp. during acid challenge: A model study using polyethersulfone membranes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 86-92, 2002.
- GEORGE, S.M.L.; RICHARDSON, L.C.C.; POL, I.E.; PECK, M.W. Effect of oxygen concentration and redox potential on recovery of sublethally heat-damaged cells of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Enteritidis and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, p. 903-909, 1998.
- GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 28, p. 251-260, 2003.
- GODOY, H.T. Estudo de carotenóides e pro-vitaminas A em alimentos. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. 1993. p. 185. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).
- GOODSON, M.; ROWBURY, R.J. Habituation to normal lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sublethal acid pH value. *Letters Applied Microbiology*, v. 8, p. 77-79, 1989.
- GORDEN, J.; SMALL, P.L.C. Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 364-367, 1993.
- GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, p. 51-64, 1996.

- GREENACRE, E.J.; BROCKLEHURST, T.F.; WASPE, C.R.; WILSON, D.R.; WILSON, P.D.G. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20 degrees C: optimization and modeling. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 3945-3951, 2003.
- GREENACRE, E.J.; BROCKLEHURST, T.F. The Acetic Acid Tolerance Response induces cross-protection to salt stress in *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 112, p. 62-65, 2006.
- GUILFOYLE, D.E.; HIRSHFIELD, I.N. The survival benefit of short-chain organic acids and the inducible arginine and lysine decarboxylase genes for *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 22, p. 1-4, 1996.
- HALL, H.K.; KAREM, K.L.; FOSTER, J.W. Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Advances in Microbial Physiology*, v. 37, p. 229-64, 1995.
- HEARD, G.M.; FLEET, G.H. Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 2171-2174, 1987.
- HELANDER, I.M.; Von WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.M. Potential of lactic acid bacteria and nove antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, v. 81, p. 146-150, 1997.
- HENGGE-ARONIS, R.; KLEIN, W.; LANGE, R.; RIMMELE, M; BOOS, W. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 7918-7924, 1991.
- HILL, C.; O'DRISCOLL, B.; BOOTH, I.R. Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 28, p. 245-254, 1995.
- HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, v. 24, p. 343-362, 1995.

- HANDRO W.; BARRADAS, M.M. Sobre os óleos e da semente do pequi *Caryocar brasiliense* Camb. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 3, 1971, São Paulo. Anais... São Paulo: Ed. Blucher/USP, 1971. p. 110-113.
- HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, v. 49, p. 139-150, 1998.
- HUMPHREY, T.J., WILDE, S.J.; ROWBURY, R.J. Heat tolerance of *Salmonella typhimurium* DT 104 isolates attached to muscle tissue. *Letters in Applied Microbiology*, v. 25, p. 265-268, 1997.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Produção da extração vegetal e da silvicultura. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2005/pevs2005.pdf>>. Setembro 2007. Acesso em 26 set. 2007.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Microbial Ecology of Foods. Factors Affecting Life and Death of Microorganisms. New York. New York: Academic Press, 1980. 332 p.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Guidelines for the microbiological examination of ready-to-eat foods. Disponível em: <http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/Guidelines%20for%20Micro%20exam.pdf>. Dezembro de 2001. Acesso em: 19 out. 2006.
- IEL, S.B.; AUDIA, J.P.; YONG, K.P.; FOSTER, J.W. Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of *Salmonella enterica* acid tolerance response. *Molecular Microbiology*, v. 44, p. 1235-1250, 2002.
- INGHAM, S.C.; ULJAS, H.E. Prior storage conditions influence the destruction of *E. coli* O157: H7 during heating of apple Cider and juice. *Journal of Food Protection*, v. 61, p. 390-394, 1998.

- IRELAND. Guidelines for the interpretation of results of microbiological analysis of some ready-to-eat foods sampled at point of sale. Dublin-UK: Food Safety Authority of Ireland, 2001. 12 p.
- JANISIEWICZ, W.J.; KORSTEN, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, v. 40, p. 411-441, 2002.
- JOHANNESSEN, G.S.; LONCAREVIC, S.; KRUSE, H. Bacteriological analysis of fresh produce in Norway. *International Journal of Food Microbiology*, v. 77, p. 199-204, 2002.
- JUNEJA, V.K.; EBLEN, B.S. Heat inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in beef as affected by fat content. *Letters in Applied Microbiology*, v. 30, p. 461-467, 2000.
- JUVEN, B.J.; BAREFOOT, S.F.; PIERSON, M.D.; McCASKILL, L.H.; SMITH, B. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged ground beef inoculated with *Lactobacillus alimentarius* FloraCarn L-2. *Journal of Food Protection*, v. 61, p. 551-556, 1998.
- KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, v. 78, p. 80-88, 2000.
- KATINA, K.; SAURI, M.; ALAKOMI, H.-L.; MATTILA-SANDHOLM, T. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 35, p. 38-45, 2002.
- KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie*, v. 70, p. 337-349, 1988.
- KLINGBERG, T.D.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K.; ELSSER, D.; BUDDE, B.B. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, v. 105, p. 419-431, 2005.

- KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 42, p. 9-27, 1998.
- KWON, Y.M.; RICKE, S.C. Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3458-3463, 1998.
- LADO, B.H.; YOUSEF, A.E. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 433-440, 2002.
- LAITILA, A.; ALAKOMI, H.-L.; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; HAIKARA, A. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 566-576, 2002.
- LEE, I.S.; SLONCZEWSKI, J.L.; FOSTER, J.W. A low-pH inducible stationary phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, v. 176, p. 1422-1426, 1994.
- LEE, I.S.; LIN, J.; HALL, H.K.; BEARSON, B.; FOSTER, J.W. The stationary-phase sigma factor σ^S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, v. 17, p. 155-167, 1995.
- LEENANON, B.; DRAKE, M.A. Acid stress, starvation, and cold stress affect post stress behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *E. coli*. *Journal of Food Protection*, v. 64, p. 970-4, 2001.
- LEISTNER, L; GORRIS, L.G.M. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science & Technology*, v. 6, p. 41-46, 1995.
- LEMAY, M.J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P.J.; GARIÉPY, C.; RODRIGUE, N; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*, v. 78, p. 217-226, 2002.

- LEYER, G.J.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Applied Environmental Microbiology*, v. 58, p. 2075-2080, 1992.
- LEYER, G.J.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, p. 1842-1847, 1993.
- LEYER, G. J.; WANG, L.L.; JOHNSON, E.A. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied Environmental Microbiology*, v. 61, p. 3752-3755, 1995.
- LIM, K. S.; HUH, C. S.; BAEK, Y. J. Antimicrobial susceptibility of Bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 2168-2174, 1993.
- LIMA, M.T. Caracterização química e física do fruto do pequi. Fortaleza: Centro de Ciências Agrárias da UFC. 1980. 61 p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- LIN, J.; LEE, I.S.; FREY, J.; SLONCZEWSKI; FOSTER, J.W. Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 177, p. 4097-4104, 1995.
- LIN, J.S.; SMITH, M.P.; CHAPIN, K.C.; BAIK, H.S.; BENNETT, G.N.; FOSTER, J.W. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 62, p. 3094-3100, 1996.
- LIN, W.H.; YU, B.; JANG, S.H.; TSEN, H.Y. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, v. 13, p. 107-113, 2007.
- LINDGREN, S.E.; DOBROGOSZ, W.J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 87, p. 149-163, 1990.

- LINE, J.E.; FAIN, A.R.; MOGAN, A.B.; MARTIN, L.M.; LECHOWICH, R.V.; CAROSELLA, J.M.; BROWN, W.L. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-value and z- value determination in ground beef. *Journal of Food Protection*, v. 54, p. 762-766, 1991.
- LITTLE, T.M.; HILLS, F.J. Statistical methods in agricultural research. Davis: University of California, 1975. 242 p.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.
- LOU, Y.; YOUSEF, A.E. Adaptation to sub-lethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied Environmental Microbiology*, v. 63, p. 1252-1255, 1997.
- LUND, B.M.; GRAHAM, A.F.; FRANKLIN, J.G. The effect of acid pH on the probability of growth of proteolytic strains of *Clostridium botulinum*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 4, p. 215-226, 1987.
- MELEIRO, C.H.A; AMAYA, D.B.R. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 17, p. 385-396, 2004.
- MAÑAS, P.; PAGAN, R.; LEGUÉRINEL, I.; CONDON, S.; MAFART, P.; SALA, F. Effect of sodium chloride concentration on the heat resistance and recovery of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 63, p. 209-216, 2001.
- MAÑAS, P.; PAGAN, R. A review - Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p. 1387-1399, 2005.
- MANTE, E.S.; SAKYI-DAWSONA, E.; AMOA-AWUA, W.K. Antimicrobial interactions of microbial species involved in the Fermentation of cassava dough into agbelima with particular Reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria On enteric pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, v. 89, p. 41-50, 2003.

- MARECHAL, P.A.; MARTÍNEZ de MARNAÑÓN, I.; POIRIER, I.; GERVAIS, P. The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms: significance for minimal food processing. *Trends in Food Science & Technology*, v. 10, p. 15-20, 1999.
- MASIH, E.I.; SLEZACK-DESCHAUMES, S.; MARMARAS, I.; AIT BARKA, E.; VERNET, G.; CHARPENTIER, C.; ADHOLEYA, A.; PAUL, B. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible Use in the biological control of *botrytis cinerea*, causing the grey Mould disease of grapevine. *FEMS Microbiology Letters*, v. 202, p. 227-232, 2001.
- MATTICK, K.L.; JØRGENSEN, F.; LEGAN, J.D.; LAPPIN-SCOTT, H.M. and HUMPHREY, T.J. Habituation of *Salmonella* spp. at Reduced Water Activity and Its Effect on Heat Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 4921-4925, 2000.
- MATTICK, K.L.; JORGENSEN, F.; WANG, P.; POUND, J.; VANDEVEN, M.H.; WARD, L.R.; LEGAN, J.D.; LAPPIN-SCOTT, H.M. Effect of challenge temperature and solute type on heat tolerance of *Salmonella* serovars at low water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 4128-4136, 2001.
- MAZZOTTA, A.S. Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *E. coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, v. 64, p. 315-320, 2001.
- McCLEERY, D.R.; ROWE, M.T. Development of a selective plating technique for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 after heat stress. *Letters in Applied Microbiology*, v. 21, p. 252-256, 1995.
- MCCANN, M.P.; KIDWELL, J.P.; MATIN, A. The putative s factor KatF has a central role in the development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 4188-4194, 1991.

- McGUIRE, R.G. Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biocontrol of *Penicillium digitatum* on grapefruits. *Biological Control*, v. 4, p. 1-7, 1994.
- MELO JÚNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S. R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Scientia Forestalis*, v. 66, p. 56-65, 2004.
- MEZIANE, H.; GAVRIEL, S.; ISMAILOV, Z.; CHET, I.; CHERNIN, L.; HÖFTE, M. Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, v. 39, p. 125-133, 2006.
- MILLER, L. G.; KASPAR, C.W. *Escherichia coli* O157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection*, v. 57, p. 460-464, 1994.
- MINAS GERAIS. Lei nº 10.883, de 2 de outubro de 1992. Declara de preservação permanente, de interesse comum e imune de corte, no estado de Minas Gerais, o pequi (*Caryocar brasiliense*) e dá outras providências. Belo Horizonte: Diário do Executivo do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, 03 out. 1992, p. 7.
- MINAS GERAIS. Decreto n. 42646, 5 de junho de 2002. Regulamenta a Lei n. 13965, de 27 de julho de 2001, que cria o Programa Mineiro de Incentivo ao Cultivo, à Extração, ao Consumo, à Comercialização e à Transformação do Pequi e demais Frutos e Produtos Nativos do Cerrado. Belo Horizonte: Diário Oficial do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, 06 jun. 2002, p. 22.
- MIRANDA, J.S.; OLIVEIRA FILHO, J.L. Fenologia e produção do piqui (*Caryocar* spp.) em região de ocorrência natural da espécie no Estado do Piauí. Teresina: EMBRAPA-UEPAE, 1990. 4 p.

- MOLIN, G.; JEPPSSON, B.; JOHANSSON, M.L.; AHRNÉ, S.; NOBAEK, S.; STÁHL, M.; BENGMARK, S. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestine. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 74, p. 314-323, 1993.
- MUYANJA, C.M.B.K.; NARVHUS, J.A.; TREIMO, J.; LANGSRUD, T. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 80, p. 201-210, 2003.
- NIGATU, A.; AHRNÉ, S.; MOLIN, G. Temperature-Dependent Variation in API 50 CH Fermentation Profiles of *Lactobacillus* Species. *Current Microbiology*, v. 41, p. 21-26, 2000.
- NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 34, p. 371-401, 1994.
- NUNES, C.; USALLL, J.; TEIXIDO, N.; FONS, E.; VIÑAS, I. Postharvest biological control by *Pantoea agglomerans* (CPA-2) on Golden delicious apples. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, p. 247-255, 2002.
- OBAGWU, J.; KORSTEN, L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*, v. 28, p. 187-194, 2003.
- O'BYRNE, C.P.; BOOTH, I.R. Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, p. 203-216, 2002.
- OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strain due to production of lactic acid. *International Journal of Food Microbiology*, v. 68, p. 135-140, 2001.

- OLIVARES, M.; DIAZ-ROPERO, M.P.; MARTIN, R.; RODRIGUEZ, J.M.; XAUS, J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, p. 72-79, 2006.
- OLIVEIRA, M.N.S.; GUSMÃO, E.; LOPES, P.S.N.; SIMÕES, M.O.M.; RIBEIRO, L.M.; DIAS, B.A.S. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 28, p. 380-386, 2006.
- OPAS (Organização Panamericana de Saúde). HACCP: Instrumento essencial para a inocuidade de alimentos. Buenos Aires: OPAS, 2001. 333 p.
- PALPACELLI, V.; CIANI, M.; ROSINI, G. Activity of different “killer” yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry. *FEMS Microbiology Letters*, v. 84, p. 75-78, 1991.
- PARK, Y.K.; BEARSON, B.; BANG, S.H.; BANG, I.S.; FOSTER, J.W. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, v. 20, p. 605-611, 1996.
- PASSOTH, V.; FREDLUND, E.; DRUVEFORS, U.A. SCHNURER, J. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 3-13, 2006.
- PEIXOTO, A.R. Plantas oleaginosas arbóreas. São Paulo, Nobel, 1973. 284 p.
- PHLS. Public Health Laboratory Services. Microbiological guidelines for some ready-to-eat foods sampled at the point of sale: An expert opinion from the PHLS. *PHLS Microbiology Digest*, v. 13, p. 41-53, 1996.
- PIMENTEL-GOMES, F. Curso de estatística experimental. Piracicaba: F. Pimentel-Gomes, 2000. 477 p.

- PINHEIRO, N. M. S.; FIGUEIREDO, E. A. T.; FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; SOUZA, P. H. M. Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 27, p. 153-156, 2005.
- PINTO, U. M.; CARDOSO, R. R.; VANETTI, M. C. D. Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. *Revista de Nutrição*, v. 17, p. 319-326, 2004.
- POYNTER, D.; HICKS, S.J.; ROWBURY, R.J. Acid resistance of attached organisms and its implications for the pathogenicity of plasmid-bearing *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 3, p. 117-121, 1986.
- POZO, O. V. C. O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no Norte de Minas Gerais. Lavras: Departamento de Administração e Economia Rural. 1997. 100 p. (Dissertação, Mestrado em Administração Rural).
- PSANI, M.; KOTZEKIDOU, P. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, p. 329-1336, 2006.
- RAGHUBEER, R.V.; KE, J.S; CAMPBELL, M.L.; MEYER, R.S. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and others coliforms in commercial mayonnaise and refrigerated salad dressing. *Journal of Food Protection*, v. 58, p. 494-498, 1995.
- RAMOS, M.I.L.; UMAKI, M.C.S.; HIANE, P.A.; RAMOS FILHO, M.M. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides próvitamínicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). *Boletim CEPPA*, v. 19, p. 23-32, 2001.
- RASPOR, P.; MILEK, D.M.; POLANC, J.; MOŽINA, S.S.; ČADEŽ, N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, v. 109, p. 97-102, 2006.

- REID, G.; BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, v. 4, p. 319-324, 2002.
- RESTAINO, L.; LENOVICH, L.M.; BILLS, S. Effect of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *Journal of Food Protection*, v. 45, p. 1138-1142, 1982.
- RIBEIRO, J.F.; FONSECA, C.E.L. da; ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.B.; SILVA, J.A.; SANO, S.M. Espécies arbóreas de uso múltiplo da região do cerrado: caracterização botânica, uso potencial e reprodução. In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE SISTEMAS AGROFLORESTAIS, 1, 1994, Porto Velho. Anais... Porto Velho: EMBRAPA/CNPF, 1994. p. 335-356.
- ROBERTS, T.A. Microbial growth and survival: Developments in predicative modeling. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 36, p. 297-309, 1995.
- RODRIGUES, K. L.; GOMES, J. P.; CONCEIÇÃO, R. C. S. Condições higiênic-sanitárias no comércio ambulante de alimentos em Pelotas-RS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 447-452, 2003.
- ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 53-60, 2007.
- ROLLER, S. The Quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status report on a European Research project. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 36, p. 333-345, 1995.
- ROSINI, G. Interaction between killer strains of *Hansenula anomala* var. *anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* yeast species. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 300-302, 1985.

- ROSINI, G.; CANTINI, M. Killer character in *Kluyveromyces* yeasts: activity on *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 44, p. 81-84, 1987.
- ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, p. 3-16, 2002.
- ROWBURY, R.J. An assessment of environmental factors influencing acid tolerance and sensitivity in *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and other enterobacteria. *Letters in Applied Microbiology*, v. 20, p. 333-337, 1995.
- ROWBURY, R.J. Regulatory components, including integration host factor, CysB and H-NS, that influence pH responses in *Escherichia coli* - a review. *Letters in Applied Microbiology*, v. 24, p. 319-28, 1997.
- RUIZ, B.G.; VARGAS, R.G.; GARCIA-VILLANOVA, R. Contamination of fresh vegetables during cultivation and marketing. *International Journal of Food Microbiology*, v. 4, p. 285-291, 1987.
- RUSSELL, A.D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 71, p. 191-201, 1991.
- RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, v. 45, p. 185-193, 1998.
- RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Changes in heat tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to acidic environments. *Food Microbiology*, v. 16, p. 317-324, 1999a.
- RYU, J.H.; BEUCHAT, L.R. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, v. 45, p. 185-193, 1999b.

- SAGOO, S.K.; LITTLE, C.L.; WARD, L.; GILLESPIE, I.A.; MITCHELL, R.T. Microbiological study of ready-to-eat salad vegetables from retail establishments uncovers a national outbreak of salmonellosis. *Journal of Food Protection*, v. 66, p. 403-409, 2003.
- SALIH, M.A.; SANDINE, W.E.; AYRES, J.A. Inhibitory effect of Microgard on yoghurt and cottage cheese spoilage organisms. *Journal Dairy Science*, v. 73, p. 887-889, 1990.
- SALLEH, N.A.; RUSUL, G.; HASSAN, Z.; REEZAL, A.; ISA, S.H.; NISHIBUCHI, M.; RADU, S. Incidence of *Salmonella* spp. In raw vegetables in Selangor, Malaysia. *Food Control*, v. 14, p. 475-479, 2003.
- SALUSTIANO, V. C.; ANDRADE, N. J.; BRANDÃO, S. C. C. AZEVEDO, R. M. C.; LIMA, S. A. K. Microbiological air quality of processing areas in a dairy plant as evaluated by the sedimentation technique and a one-stage air sampler. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 255-259, 2003.
- SANTOS, A; SANCHEZ, A.; MARQUINA, D. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, v. 159, p. 331-338, 2004.
- SHEN, H.W.; YU, R.C.; CHOU, C.C. Acid adaptation affects the viability of *Salmonella typhimurium* during the lactic fermentation of skim milk and product storage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 114, p. 380-385, 2007.
- SIQUEIRA, M. I.; GERALDINE, R. M.; QUEIROZ, K. S.; TORRES, M. C. L.; SILVEIRA, M. F. A. Conserva de pequi. Goiânia: Universidade Federal de Goiás (UFG), 1997. 22 p.
- SOUZA, O.O.A. Caracterização física de frutos e propagação sexuada de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de diferentes regiões do Estado de Goiás. Estrutura do fruto e da semente do pequi, *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae). Goiânia: Escola de Agronomia da UFG. 2005. 57p. (Dissertação, Mestrado em Agronomia).

- STEPHENS, P.J.; JOYNSON, J.A.; DAVIES, K.W.; HOLBROOK, R.; LAPPINSCOTT, H.M.; HUMPHREY, T.J. The use of an automated growth analyzer to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *Journal of Applied Microbiology*, v. 83, p. 445-455, 1997.
- STEVENS, K.A.; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A.; KLAENHAMMER, T.R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 3613-3615, 1992.
- STOPFORTH, J.D.; IKEDA, J.S.; KENDALL, P.A.; SOFOS, J.N. Survival of acid-adapted or nonadapted *Escherichia coli* O157:H7 in apple wounds and surrounding tissue following chemical treatments and storage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 90, p. 51-61, 2004.
- SULLIVAN, A; NORD, C.E. The place of human probiotics in human intestinal infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 20, p. 313-319, 2003.
- TANTILLO, M.G.; DI, P.A.; NOVELLO, L. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* as starter culture in dry sausages. *New Microbiology*, v. 25, p. 45-49, 2002.
- TAUXE, R.; KRUSE, H.; HEDBERG, C.; POTTER, M.; MADDEN, J.; WACHSMUTH, K. Microbial hazards and emerging issues associated with produce - a preliminary report to the national advisory committee on microbiologic criteria for foods. *Journal of Food Protection*, v. 60, p. 1400-1408, 1997.
- TEIXEIRA, L.C.; GONÇALVES, R.A.; SOUZA, R.E.; COUTO, J.G.C. Industrialização do pequi (*Caryocar brasiliense*). In CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 18, 2004, Florianópolis. Anais... Florianópolis: SBF, 2004. CD-ROM.
- THUNBERG, R.L.; TRAN, T.T.; BENNETT, R.W.; MATHEWS, R.N.; BELAY, N. Microbial evaluation of selected fresh produce obtained at retail markets. *Journal of Food Protection*, v. 65, p. 677-682, 2002.

- TODOROV, S.D.; KOEP, K.S.C.; VAN REENEN, C.A.; HOFFMAN, L.C.; SLINDE, E.; DICKS, L.M.T. Production of salami from beef, horse, mutton, Blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*) and Springbok (*Antidorcas marsupialis*) with bacteriocinogenic strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus*. *Meat Science*, v. 77, p. 405-412, 2007.
- TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 112, p. 230-235, 2006.
- TORREZAN, R; EIROA, M. N. U; PFENNING, L. Identificação de microrganismos isolados em frutas, polpas e ambiente industrial. *Boletim CEPPA*, v. 18, p. 27-38, 2000.
- TOURNAS, V.H.; KATSODAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, v. 105, p. 11-17, 2005.
- TOURNAS, V.H.; HEERES, J.; BURGESS, L. Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, v. 23, p. 684-688, 2006.
- TRINDADE, R.C.; RESENDE, M.A.; SILVA, C.M.; ROSA, C.A. Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps of Brazilian Tropical Fruits. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, p. 294-300, 2002.
- TSAI, Y.-W.; INGHAM, S.C. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments. *Journal of Food Protection*, v. 60, p. 751-755, 1997.
- VALENZUELA, A.S.; RUIZ, G.D.; OMAR, N.B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; CAÑAMERO, M.M.; ORTEGA, E.; GÁLVEZ, A. Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben saalga, both in a culture medium and in food. *Food Control*, Available online 29 August 2007, DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.08.009, 2007.

- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, v. 60, p. 407-438, 1996.
- VAN DER AA KUHLE, A; SKOVGAARD, K; JESPERSEN, L. In vitro screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii* and foodborne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, v. 101, p. 29-40, 2005.
- VERA, R.; NAVES, R.V.; NASCIMENTO, J.L.; CHAVES, L.J.; LEANDRO, W.M.; SOUZA, E.R.B. Caracterização física de frutos do pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no Estado de Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 35, p. 71-79, 2005.
- VERA, R.; SOUZA, E.R.B.; FERNANDES, E.P.; NAVES, R.V.; SOARES JÚNIOR, M.S.; CALIARI, M.; XIMENES, P.A. Caracterização física e química de frutos do pequiheiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) oriundos de duas regiões no Estado de Goiás, Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 37, p. 93-99, 2007.
- VILELA, G.F. Variações em populações naturais de *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae): fenológicas, genéticas e de valores nutricionais de frutos. Lavras: Departamento de Engenharia Florestal da UFLA. 1998. 88p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Florestal).
- WADLIN, J.K.; HANKO, G.; STEWART, R.; PAPE, J.; NACHAMKIN, I. Comparison of Three Commercial Systems for Identification of Yeasts Commonly Isolated in the Clinical Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, p. 1967-1970, 1999.
- WALKER, G.M.; McLEOD, A.H.; HODGSON, V.J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, v. 127, p. 213-222, 1995.
- WARTH, A.D. Effects of benzoic acid on growth yields of yeasts differing in their resistance to preservatives. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 3415-3417, 1988.

- WATERMAN, S.R.; SMALL, P.L.C. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 3882-3886, 1998.
- WELLS, J.M.; BUTTERFIELD, J.E. *Salmonella* contamination associated with bacterial soft rot of fresh fruits and vegetables in the marketplace. *Plant Disease*, v. 81, p. 867-872, 1997.
- WHO (World Health Organization). Food safety and foodborne illness. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>>. Março 2007. Acesso em: 09 mar. 2007.
- WILMES-RIESENBERG, M. R.; BEARSON, B.; FOSTER, J.W.; CURTISS III, R. Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*, v. 64, p. 1085-1092, 1996.
- WILSON, A.R.; SIGEE, D.; EPTON, H.A.S. Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, p. 1516-1522, 2005.
- XAVIER, I.J.; INGHAM, S.C. Increased D-values for *Salmonella* Enteritidis following heat shock. *Journal of Food Protection*, v. 60, p. 181-184, 1997.
- YU, T.; ZHENG, X. Salicylic acid enhances biocontrol efficacy of the antagonist *Cryptococcus laurentii* in apple fruit. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 25, p. 166-174, 2006.
- YU, T.; CHEN, J.; CHEN, R.; HUANG, B.; LIU, D.; ZHENG, X. Biocontrol of blue and gray mold diseases of pear fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid. *International Journal of Food Microbiology*, v. 116, p. 339-345, 2007.

- YU, T.; LI, H.; ZHENG, X. Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *International Journal of Food Microbiology*, v. 114, p. 261-266, 2007.
- YUK, H.G.; SCHNEIDER, K.R. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. *Food Microbiology*, v. 23, p. 694-700, 2006.
- YUSTE, J.; FUNG, D.Y.C. Evaluation of *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* counts in apple juice with cinnamon, by conventional media and thin agar layer method. *Food Microbiology*, v. 20, p. 365-370, 2003.
- ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; BESSER, R. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider with and without preservatives. *Applied Environmental Microbiology*, v. 59, p. 2526-2530, 1993.
- ZEITOUN, A.A.M.; DEBEVERE, J.M.; MOSSEL, D.A.A. Significance of Enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh untreated poultry treated with lactic acid and poultry stored in a modified atmosphere. *Food Microbiology*, v. 11, p. 169-176, 1994.

APÊNDICE I

World J Microbiol Biotechnol (2007) 23:1179–1181

DOI 10.1007/s11274-006-9335-x

ORIGINAL PAPER

**Microbiological evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) preserves made
from a typical Brazilian fruit**

Luiz C. Ferreira . Roberto G. Junqueira